

# **Biomarcadores inmunitarios en pacientes con cáncer de pulmón tratados con quimio- inmunoterapia neo-adyuvante**

Oncología Molecular

Programa de Doctorado de Biociencias Moleculares

Departamento de Bioquímica. Facultad de Medicina

Universidad Autónoma de Madrid

Raquel Laza Briviesca

Madrid, 2021



Departamento de Bioquímica, Facultad de Medicina

Universidad Autónoma de Madrid

# **Biomarcadores inmunitarios en pacientes con cáncer de pulmón tratados con quimio- inmunoterapia neo-adyuvante**

## **Autora**

Raquel Laza Briviesca, Licenciada en Biología

## **Directores de tesis**

Dr. Mariano Provencio Pulla y Dr. Alberto Cruz Bermúdez

## **Tutor de tesis**

Dr. Oscar Hernan Martínez-Costa Pérez

Instituto de Investigación Sanitaria Puerta de Hierro-Segovia de Arana

Hospital Universitario Puerta de Hierro-Majadahonda

Mariano Provencio Pulla, Doctor en Medicina, Profesor titular de la Universidad Autónoma de Madrid e investigador principal del grupo de Investigación en Cáncer de Pulmón del Instituto de Investigación Sanitaria Puerta de Hierro Segovia de Arana y Alberto Cruz Bermúdez, Doctor en Biociencias Moleculares e investigador del grupo de Investigación en Cáncer de Pulmón del Instituto de Investigación Sanitaria Puerta de Hierro Segovia de Arana.

CERTIFICAN:

Que Raquel Laza Briviesca, Licenciada en Biología por la Universidad Autónoma de Madrid, ha realizado bajo su dirección el trabajo de investigación correspondiente a su Tesis Doctoral con el título:

**Biomarcadores inmunitarios en pacientes con cáncer de pulmón tratados con quimio-inmunoterapia neo-adyuvante**

Revisado este trabajo, se considera que reúne las condiciones de calidad, contenido y forma exigidas y se autoriza su presentación para ser evaluado por el tribunal correspondiente.

Y para que así conste y a los efectos oportunos se firma el presente certificado en Madrid a 29 de abril de 2021.

Fdo. Mariano Provencio

Fdo. Dr. Alberto Cruz Bermúdez

“A mi madre y mi hermana,  
por ser las luces que iluminan mi vida”

*“Lo que llamamos absurdo es nuestra ignorancia”*

Julio Cortázar

*“Investigar es ver lo que todo el mundo ya ha visto y pensar lo que nadie ha pensado”*

Albert Szent-Györgyi



## **Aprobación del estudio y fuentes de financiación**

El trabajo presentado en esta memoria titulado “Biomarcadores inmunitarios en pacientes con cáncer de pulmón tratados con quimio-inmunoterapia neo-adyuvante” ha sido realizado en el laboratorio de Oncología Médica del Instituto de Investigación Sanitaria Puerta de Hierro-Segovia de Arana (IDIPHIM). La realización de este trabajo ha sido posible gracias a la financiación de Bristol-Myers Squibb, el Instituto de Salud Carlos III (PI19/01652), Horizonte 2020, Clarify (875160).

La doctoranda Raquel Laza Briviesca ha sido financiada a través de la Comunidad de Madrid y el fondo Social Europeo con contrato de Ayudante de Investigación (PEJ16/MED/AI-1972) y contrato Pre doctoral (PEJD-2018-PRE/SAL-8641).

El desarrollo del ensayo clínico y la recogida de muestras de pacientes ha sido organizado y promovido por el Grupo Español de Cáncer de Pulmón (GECP) de acuerdo a la declaración de Helsinki y las Reglas de Buena Práctica Clínica del Comité Europeo.

## Resumen

**Introducción.** La quimio-inmunoterapia está siendo evaluada como tratamiento neoadyuvante en pacientes con estadios intermedios de cáncer de pulmón de célula no pequeña (CPCNP), consiguiendo unas tasas altas de respuestas patológicas completas (CPR) que tradicionalmente se han asociado a mayor supervivencia global. La identificación temprana de los pacientes que puedan alcanzar CPR sería de gran importancia clínica. Este estudio se centra en la búsqueda de biomarcadores asociados a CPR mediante el análisis de muestras de tejido y sangre periférica al momento del diagnóstico, así como el efecto del tratamiento sobre las células inmunitarias y su posible implicación en la respuesta al tratamiento.

**Métodos.** Se obtuvieron muestras sanguíneas al diagnóstico y post tratamiento neoadyuvante de pacientes con CPCNP estadio IIIA potencialmente resecable que participaron en el ensayo clínico NADIM (NCT03081689). Se estudiaron más de 400 biomarcadores inmunitarios en sangre periférica y más de 30 poblaciones inmunitarias infiltradas en tejido tumoral.

**Resultados.** El tratamiento neo-adyuvante con quimio-inmunoterapia tiene un efecto sobre más de 150 biomarcadores inmunitarios. Se encontraron doce posibles marcadores asociados a la respuesta patológica en sangre periférica con un área bajo la curva ROC > 0.70 con p-valor significativo. Al diagnóstico, los pacientes que alcanzan CPR en la cirugía tenían niveles altos de células CD4<sup>+</sup>PD-1<sup>+</sup>, expresión de NKG2D y CD56 en células T CD56<sup>+</sup>, expresión de CD25 en células CD4<sup>+</sup>CD25<sup>hi</sup> y expresión de CD69 en monocitos intermedios; pero niveles bajos de células CD3<sup>+</sup>CD56<sup>-</sup>CTLA-4<sup>+</sup>, CD14<sup>++</sup>CD16<sup>+</sup>CTLA-4<sup>+</sup>, expresión de CTLA-4 en células T CD56<sup>+</sup> y niveles bajos de b-NGF, NT-3 y VEGF-D en plasma, en comparación con

pacientes que no obtuvieron CPR (no-CPR). Después del tratamiento neo-adyuvante pero previamente a la cirugía, los pacientes con CPR, tenían niveles elevados de expresión de CD19 en las células B, así como niveles altos de BCMA, 4-1BB, MCSF y PARC, mientras que tenían niveles bajos de MPIF-1 y Flt-3L en plasma comparado con pacientes no-CPR.

**Conclusión.** Los pacientes con CPR presentan al diagnóstico un sistema inmunitario con un fenotipo antitumoral aumentado, basado en una mayor citotoxicidad, reconocimiento antigénico y menor inhibición, que podría predisponer a estos pacientes a mejores respuestas al tratamiento con quimio-inmunoterapia neo-adyuvante. Estas diferencias entre pacientes a nivel basal abren la posibilidad de identificar biomarcadores predictivos de CPR basados en la caracterización del sistema inmunitario a nivel periférico.

## Abstract

**Introduction.** Chemo-immunotherapy is being tested as neoadjuvant treatment for early stages of non-small cell lung cancer (NSCLC), achieving a high rate of complete pathological responses (CPR) that has been associated to longer overall survival. Early identification of patients obtaining CPR has vital clinical implications. This study is focused on finding biomarkers associated to CPR through the analysis of tissue and peripheral blood samples at diagnosis, as well as, the treatment effect on immune cells and their implication on treatment response.

**Methods.** Blood samples from stage IIIA NSCLC patients participating in the NADIM trial (NCT03081689) were collected at diagnosis and post neoadjuvant treatment. More than 400 immune biomarkers in peripheral blood and more than 30 immune populations in tumoural tissue were analyzed.

**Results:** Neoadjuvant chemo-immunotherapy has an effect in more than 150 immune biomarkers. Twelve putative predictive biomarkers were found, with an area under the ROC curve  $> 0.70$  and  $p\text{-value} < 0.05$ . At diagnosis, patients that achieved CPR at surgery had significantly higher levels of CD4<sup>+</sup>PD-1<sup>+</sup> cells, NKG2D and CD56 expression on T CD56<sup>+</sup> cells, CD25 expression on CD4<sup>+</sup>CD25<sup>hi</sup> cells and CD69 expression on intermediate monocytes; but lower levels of CD3<sup>+</sup>CD56<sup>-</sup>CTLA-4<sup>+</sup> cells, CD14<sup>++</sup>CD16<sup>+</sup>CTLA-4<sup>+</sup> cells, CTLA-4 expression on T CD56<sup>+</sup> cells and lower levels of b-NGF, NT-3 and VEGF-D in plasma compared to patients that did not obtain CPR (non-CPR). Post-treatment but prior to surgery, CPR patients had

significantly higher levels of CD19 expression on B cells, BCMA, 4-1BB, MCSF and PARC and lower levels of MPIF-1 and Flt-3L in plasma compared to non-CPR patients.

**Conclusions:** At diagnosis CPR patients present an immune system with a higher antitumor phenotype, based on higher cytotoxicity, antigen recognition and lower inhibition, that could predispose these patients to achieve better responses to neoadjuvant chemo-immunotherapy treatment. These differences at diagnosis between patients open the possibility to identify predictive biomarkers of CPR based on immune system characterization at peripheral level.

# Contenido

<b>1 INTRODUCCIÓN .....</b>	<b>1</b>
1.1 Cáncer de pulmón .....	1
1.1.1 Incidencia y epidemiología .....	1
1.1.2 Diagnóstico y estadificación .....	2
<i>Tabla 1. Clasificación TNM 8th edición .....</i>	<i>3</i>
1.1.3 Tratamientos .....	4
<i>Tabla 2. Supervivencia global a 24 meses de los diferentes estadios de CPCNP .....</i>	<i>4</i>
<i>Figura 1. Supervivencia a 24 meses .....</i>	<i>4</i>
<i>Figura 2. Mecanismo de acción de nivolumab (anti-PD-1) .....</i>	<i>6</i>
1.1.4 Marcadores utilizados en la práctica clínica .....	7
1.2 Sistema inmunitario: linfocitos y funciones .....	8
1.3 Microambiente tumoral .....	9
<i>Figura 3. Inmunoedición del cáncer .....</i>	<i>10</i>
1.3.1 Inmunidad antitumoral .....	10
1.3.2 Mecanismos de evasión .....	12
1.3.3 Biomarcadores inmunitarios emergentes .....	14
1.3.3.1 Células inmunitarias infiltradas en tejido tumoral .....	14
1.3.3.2 Células inmunitarias en sangre periférica .....	15
1.3.3.3 Factores solubles inmunitarios en sangre periférica .....	16
<b>2 HIPÓTESIS Y OBJETIVOS DEL ESTUDIO .....</b>	<b>19</b>

<b>3 MATERIAL Y MÉTODOS .....</b>	<b>21</b>
3.1 Diseño del estudio .....	21
<i>Figura 4. Esquema del ensayo clínico NADIM .....</i>	<i>22</i>
<i>Tabla 3. Disponibilidad de muestras en cada técnica .....</i>	<i>22</i>
3.2 Hemogramas .....	23
3.3 Inmunofluorescencia multiplexada en FFPE .....	24
<i>Tabla 4. Selección muestras para técnica inmunofluorescencia.....</i>	<i>24</i>
<i>Tabla 5. Paneles utilizados en la inmunofluorescencia multiplexada.....</i>	<i>26</i>
3.4 Procesamiento de muestras de sangre .....	26
3.5 Protocolo de tinción celular para citometría de flujo .....	26
<i>Tabla 6. Diseño paneles citometría utilizados para el inmunofenotipado.....</i>	<i>27</i>
3.5.1 Estrategia de análisis de poblaciones inmunitarias en sangre periférica.....	28
<i>Figura 5. Estrategia de análisis inicial común a los 4 paneles de citometría .....</i>	<i>28</i>
<i>Figura 6. Estrategia de análisis de células NK y células T del panel 1 .....</i>	<i>29</i>
<i>Figura 7. Estrategia de análisis de células NK y células T del panel 2 .....</i>	<i>30</i>
<i>Figura 8. Estrategia de análisis de células T y B del panel 3 .....</i>	<i>31</i>
<i>Figura 9. Estrategia de análisis de células T del panel 4 .....</i>	<i>32</i>
<i>Figura 10. Estrategia de análisis de monocitos usando el panel 1 y 2.....</i>	<i>33</i>
3.6 Factores solubles y citoquinas.....	33
<i>Figura 11. Metodología del array de citoquinas. ....</i>	<i>34</i>
<i>Tabla 7A. Citoquinas estudiadas en el plasma de los pacientes con CPCNP.....</i>	<i>34</i>
<i>Tabla 7B. Citoquinas estudiadas en el plasma de los pacientes con CPCNP .....</i>	<i>35</i>
3.7 Estadística.....	35
<b>4 RESULTADOS .....</b>	<b>37</b>
4.1 Características clínicas de los pacientes.....	37
4.1.1 Respuestas patológicas.....	37
<i>Figura 12. Curvas de SLP (A) y SG (B) con respecto a la respuesta patológica .....</i>	<i>38</i>
4.1.2 Hemogramas.....	38
<i>Tabla 8A. Hemogramas pre tratamiento por grupos de respuesta patológica .....</i>	<i>38</i>
<i>Tabla 8B. Hemograma post tratamiento por grupos de respuesta patológica .....</i>	<i>39</i>
<i>Figura 13. Efecto del tratamiento global en las poblaciones celulares del hemograma.</i>	<i>39</i>

<i>Figura 14. Efecto del tratamiento por respuesta patológica en las poblaciones celulares del hemograma.</i>	40
<i>Figura 15. Efecto del tratamiento en los ratios celulares del hemograma.</i>	41
<i>Tabla 9. Respuesta patológica versus LIPI score.</i>	42
<i>Figura 16. Efecto del tratamiento en el LIPI score.</i>	42
4.2 Características moleculares de los pacientes	43
4.2.1 Microambiente tumoral	43
<i>Figura 17. Ejemplo de análisis de la técnica de inmunofluorescencia multiplex.</i>	44
4.2.1.1 Biomarcadores al diagnóstico	44
<i>Figura 18. Infiltración celular en el tumor por respuesta patológica en biopsias al diagnóstico.</i>	45
<i>Figura 19. Infiltración celular en el estroma por respuesta patológica en biopsias al diagnóstico.</i>	46
4.2.1.2 Biomarcadores post tratamiento neo-adyuvante	46
<i>Figura 20. Infiltración celular en el tumor por respuesta patológica en biopsias de la cirugía.</i>	48
<i>Figura 21. Infiltración celular en el estroma por respuesta patológica en biopsias de la cirugía.</i>	49
4.2.1.3 Variación en biomarcadores tras el tratamiento neo-adyuvante	50
<i>Figura 22. Efecto del tratamiento en el tumor de biopsias al diagnóstico y cirugía.</i>	50
<i>Figura 23. Efecto del tratamiento en el estroma de biopsias al diagnóstico y cirugía.</i>	51
4.2.2 Células inmunitarias en sangre periférica	51
<i>Figura 24. Análisis de células NK y células T del panel 1.</i>	52
<i>Figura 25. Análisis de células NK y células T del panel 2.</i>	53
<i>Figura 26. Análisis de células B y células T del panel 3.</i>	54
<i>Figura 27. Análisis de células B y células T del panel 4.</i>	55
<i>Figura 28. Análisis de monocitos.</i>	55
4.2.2.1 Biomarcadores al diagnóstico	56
<i>Figura 29. Biomarcadores en células T CD4.</i>	57
<i>Figura 30. Biomarcadores en células T CD8.</i>	58
<i>Figura 31. Biomarcadores en células T CD56<sup>+</sup>.</i>	59
<i>Figura 32. Biomarcadores en células NK.</i>	60
<i>Figura 33. Biomarcadores en monocitos.</i>	61
4.2.2.2 Biomarcadores post tratamiento neo-adyuvante	62



<i>Figura 34. Células T CD4 post tratamiento asociadas a respuesta patológica</i> .....	62
<i>Figura 35. Células T CD56 post tratamiento asociadas a respuesta patológica</i> .....	63
<i>Figura 36. Células B post tratamiento asociadas a respuesta patológica</i> .....	64
4.2.2.3 Variación en biomarcadores tras el tratamiento neo-adyuvante .....	64
<i>Figura 37. Efecto del tratamiento en poblaciones inmunitarias</i> .....	65
<i>Figura 38. Efecto del tratamiento en subpoblaciones de células inmunitarias</i> .....	66
4.2.3 Factores solubles en sangre .....	67
4.2.3.1 Biomarcadores al diagnóstico .....	67
<i>Figura 39. Citoquinas al diagnóstico asociadas a respuesta patológica</i> .....	68
4.2.3.2 Biomarcadores post tratamiento neo-adyuvante .....	68
<i>Figura 40. Citoquinas post tratamiento asociadas a respuesta patológica</i> .....	69
4.2.3.3 Variación en biomarcadores tras el tratamiento neo-adyuvante .....	69
<i>Figura 41. Efecto del tratamiento en factores solubles</i> .....	70
<i>Figura 42. Efecto del tratamiento en citoquinas</i> .....	71
<b>5 DISCUSIÓN</b> .....	<b>73</b>
Análisis hematológico .....	74
Expresión de PD-1 en linfocitos como posible factor pronóstico .....	75
Linfocitos T memoria y células T reguladoras .....	77
Fenotipo activado de linfocitos T .....	79
Relevancia de la inmunidad innata: células NK y monocitos .....	82
Relevancia de la inmunidad humoral: células B .....	84
Neurotrofinas y presentación antigénica .....	85
Valor del estudio, limitaciones y futuras líneas de investigación .....	86
<b>6 CONCLUSIONES</b> .....	<b>89</b>
<b>7 CONCLUSIONS</b> .....	<b>91</b>
<b>8 REFERENCIAS</b> .....	<b>93</b>
<b>9 ANEXO I. MATERIAL SUPLEMENTARIO</b> .....	<b>117</b>
<i>Tablas 1, 2 y 3. Comparación de las poblaciones inmunitarias celulares en sangre al momento del diagnóstico (pre tratamiento) y después del tratamiento neo-adyuvante (post tratamiento) con la respuesta patológica</i> .....	117

<i>Tablas 4, 5 y 6. Efecto del tratamiento neo-adyuvante en las poblaciones inmunitarias en sangre de la totalidad de los pacientes (TOTAL), en los pacientes con respuesta patológica completa (CPR) y pacientes con respuesta patológica no completa (no CPR).....</i>	<i>120</i>
<i>Tablas 7 y 8. Comparación de los factores solubles medidos en plasma al momento del diagnóstico (pre tratamiento) y después del tratamiento neo-adyuvante (post tratamiento) con la respuesta patológica .....</i>	<i>123</i>
<i>Tablas 9 y 10. Efecto del tratamiento neo-adyuvante en los factores solubles medidos en plasma de la totalidad de los pacientes (TOTAL), en los pacientes con respuesta patológica completa (CPR) y pacientes con respuesta patológica no completa (no CPR).....</i>	<i>125</i>
<b>10 ANEXO II. CURRICULUM VITAE Y PUBLICACIONES CIENTÍFICAS .....</b>	<b>129</b>

## Clave de abreviaturas

<b>APC</b>	Célula presentadora de antígeno
<b>AUC</b>	Área bajo la curva
<b>BTLA</b>	Atenuador de linfocitos T y B
<b>CD</b>	Grupos de diferenciación
<b>CPCNP</b>	Cáncer de pulmón de célula no pequeña
<b>CPCP</b>	Cáncer de pulmón de célula pequeña
<b>CPR</b>	Respuesta patológica completa
<b>CTLA-4</b>	Antígeno 4 del linfocito citotóxico
<b>dNLR</b>	Proporción (ratio) derivada de neutrófilo-linfocito
<b>EDTA</b>	Ácido etilendiaminotetraacético
<b>GECP</b>	Grupo español de cáncer de pulmón
<b>GMCSF</b>	Factor estimulante de colonias de granulocitos
<b>H&amp;E</b>	Hematoxilina-eosina
<b>HUPHM</b>	Hospital Universitario Puerta de Hierro Majadahonda
<b>ICIs</b>	Inhibidores de punto de control
<b>IFN-<math>\alpha</math></b>	Interferón alfa
<b>IFN-<math>\gamma</math></b>	Interferón gamma
<b>IL</b>	Interleuquina
<b>IPR</b>	Respuesta patológica incompleta
<b>LDH</b>	Lactato deshidrogenasa
<b>M:L</b>	Proporción (ratio) mieloide-linfocito

<b>MCSF</b>	Factor estimulante de colonias de macrófagos
<b>MDSC</b>	Células mieloides supresoras
<b>MFI</b>	Mediana de intensidad de fluorocromo
<b>MHC</b>	Complejo mayor de histocompatibilidad
<b>MICA</b>	Complejo mayor de histocompatibilidad secuencia A
<b>MICB</b>	Complejo mayor de histocompatibilidad secuencia B
<b>MMP2</b>	Metaloproteinasa de matriz 2
<b>MPR</b>	Respuesta patológica mayor
<b>NADIM</b>	Inmunoterapia neo-adyuvante
<b>NK</b>	Asesinas naturales
<b>NKG2D</b>	Receptor activador de células NK grupo 2 miembro D
<b>NLR</b>	Proporción (ratio) de neutrófilo-linfocito
<b>PBMCs</b>	Células mononucleares de sangre periférica
<b>PD-1</b>	Receptor de muerte programada
<b>PD-L1</b>	Ligando 1 de muerte programada
<b>PD-L2</b>	Ligando 2 de muerte programada
<b>PET</b>	Tomografía por emisión de positrones
<b>PLR</b>	Proporción (ratio) de plaqueta-linfocito
<b>RMN</b>	Resonancia magnética nuclear
<b>ROC</b>	Característica operativa del receptor
<b>SG</b>	Supervivencia global
<b>SLP</b>	Supervivencia libre de progresión
<b>TAC</b>	Tomografía axial computarizada
<b>TAMs</b>	Macrófagos asociados a tumor
<b>TGF-<math>\beta</math></b>	Factor de crecimiento transformante beta
<b>TILs</b>	Linfocitos infiltrantes tumorales
<b>TMB</b>	Carga mutacional tumoral
<b>TNF</b>	Factor de necrosis tumoral
<b>VEGF</b>	Factor de crecimiento endotelial vascular

# Capítulo 1

## Introducción

### 1 INTRODUCCIÓN

---

Este trabajo se basa en el análisis del microambiente tumoral y en la caracterización del sistema inmunitario de pacientes con estadios localmente avanzados de cáncer de pulmón no microcítico tratados con quimio-inmunoterapia neo-adyuvante. A continuación, se detallarán los conceptos de relevancia para este estudio en las diferentes secciones de introducción.

#### 1.1 Cáncer de pulmón

##### 1.1.1 Incidencia y epidemiología

El cáncer de pulmón es una anomalía patológica de las células que recubren las vías respiratorias en el pulmón, derivada del crecimiento celular descontrolado provocado por mutaciones genéticas.

La mediana de edad de los pacientes en el diagnóstico de esta patología es de 64 años (Provencio et al. 2019) y es el segundo cáncer más común del mundo suponiendo el 12% en hombres y un 13% en mujeres de casos nuevos al año. Además, provoca el 22% de las muertes relacionadas con cáncer, siendo el tumor con la mayor tasa de mortalidad en la actualidad (Siegel et al. 2021).

La alta tasa de mortalidad puede ser debida, al menos en parte, al diagnóstico tardío de los pacientes, ya que, en la mayoría de las ocasiones, el cáncer de pulmón cursa asintomático o con sintomatología inespecífica, como dolor torácico, anorexia o astenia, entre otros. En los pacientes de cáncer de pulmón que presentan síntomas, generalmente en estadios más avanzados de la enfermedad, los más comunes son tos persistente, hemoptisis y disnea. Un estudio reciente realizado en España ha demostrado que el 28% de los pacientes con estadios localmente avanzados (estadios III) o metastásicos (estadios IV) no presentan síntomas al diagnóstico (Ruano-Raviña et al. 2020).

Existen diferentes factores exógenos implicados en el desarrollo de la patología, siendo el tabaco el principal factor de riesgo en más del 80% de los casos (Provencio et al. 2019). Otros factores ambientales son la inhalación pasiva del humo de tabaco, la contaminación, la radiación, el asbesto y el radón (Lorenzo-Gonzalez et al. 2020). Sin embargo, hay un pequeño porcentaje de pacientes que desarrollan cáncer de pulmón a pesar de ser no fumadores o de no conocerse ningún factor ambiental que haya podido influir.

### 1.1.2 Diagnóstico y estadificación

El cáncer de pulmón se puede diagnosticar mediante pruebas de imagen por tomografía axial computarizada (TAC, *Computer Axial Tomography*), resonancia magnética nuclear (RMN) o tomografía por emisión de positrones (PET, *Positron Emission Tomography*). El estudio anatomopatológico, bien mediante biopsia o citología, es imprescindible para el diagnóstico definitivo del paciente (Majem et al. 2019).

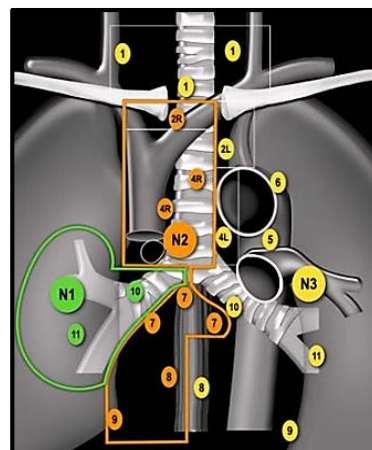
Una vez el paciente ha sido diagnosticado se procede a su clasificación según su histología en dos grandes grupos: cáncer de pulmón de célula pequeña o microcítico (CPCP) y de célula no pequeña o no microcítico (CPCNP). En el CPCNP existen diversos subtipos moleculares dependiendo de la presencia o ausencia de mutaciones específicas en genes como el factor de crecimiento epidérmico (*EGFR, epidermal growth factor receptor*), *ROS1* o el gen del receptor de la tirosina quinasa del linfoma anaplásico (*ALK, anaplastic lymphoma kinase*) entre otros (Travis et al. 2015).

El presente trabajo se centra en CPCNP, que constituye el 85% de los casos diagnosticados con cáncer de pulmón (Molina et al. 2008). Dentro de este, los tipos más frecuentes son adenocarcinoma pulmonar (40%), carcinoma escamoso o epidermoide (25%) y carcinoma de células grandes (10%) (Instituto Nacional del Cáncer 2021b).

Para realizar la estadificación, que indicará la extensión de la enfermedad, el pronóstico y el abordaje terapéutico, se utiliza la clasificación TNM (tabla 1), indicando la T el tamaño del tumor (T1 menos de 3 cm, T2 entre 3-5 cm, T3 entre 5-7 cm y T4 más de 7cm), la N la afectación de los ganglios linfáticos teniendo en cuenta su posición (dibujo junto a tabla 1 (El-Sherief et al. 2014) y la M la afectación o no de otros órganos (presencia de metástasis, M1a cerca del tumor primario, M1b metástasis extratorácica, M1c múltiples metástasis extratorácicas). Esta clasificación divide a los pacientes en estadios iniciales (estadios I y II), estadios localmente avanzados (estadios III) y estadios metastásicos (estadios IV) (Detterbeck 2018).

**Tabla 1. Clasificación TNM 8th edición**

T/M	N0	N1	N2	N3
T1a	IA1	IIB	IIIA	IIIB
T1b	IA2	IIB	IIIA	IIIB
T1c	IA3	IIB	IIIA	IIIB
T2a	IB	IIB	IIIA	IIIB
T2b	IIA	IIB	IIIA	IIIB
T3	IIB	IIIA	IIIB	IIIC
T4	IIIA	IIIA	IIIB	IIIC
M1a	IVA	IVA	IVA	IVA
M1b	IVA	IVA	IVA	IVA
M1c	IVB	IVB	IVB	IVB



Más del 30% de los pacientes con CPCNP son diagnosticados con enfermedad localmente avanzada o estadio IIIA (T4N0M0, T3-4N1M0 o T1-2N2M0) (Morgensztern et al. 2010). Este subgrupo de estadios IIIA son considerados potencialmente resecables y por tanto estos pacientes podrían beneficiarse de una cirugía de la enfermedad con intención curativa.

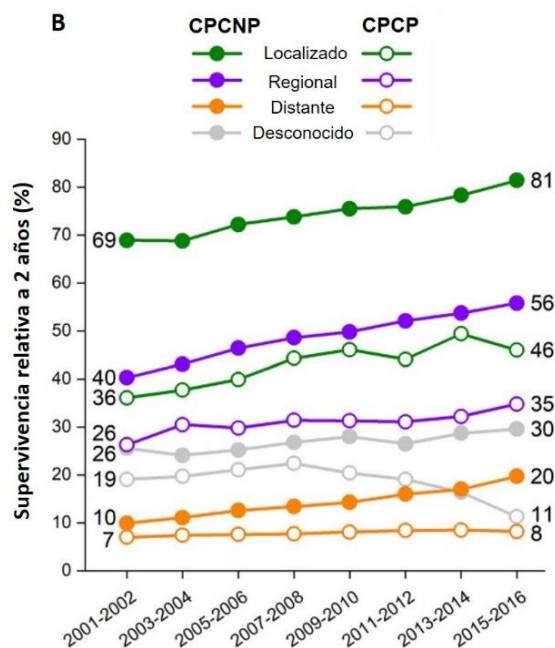
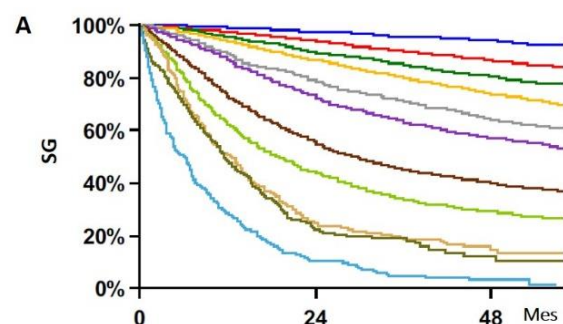
### 1.1.3 Tratamientos

El tratamiento de elección de los estadios iniciales (I y II) es la cirugía, aunque en pacientes con afectación ganglionar se tratan con quimioterapia adyuvante (Arriagada et al. 2004), mientras que el tratamiento de los estadios intermedios requiere un manejo multidisciplinar con equipos entrenados.

La radioterapia o la cirugía en estadios IIIA o IIIB, aplicadas en solitario, proporcionan unas tasas de supervivencia muy bajas, probablemente debido a la existencia de micrometástasis al diagnóstico, que justificaría el empleo de tratamientos sistémicos (Cox 1990). La quimioterapia neo-adyuvante ha sido el tratamiento estándar durante los últimos 20 años. Tras ella, se evalúa la respuesta por PET o TAC y en aquellos pacientes que consiguen negativización de la afectación mediastínica se realiza cirugía posterior (Postmus et al. 2017).

**Tabla 2. Supervivencia global a 24 meses de los diferentes estadios de CPCNP**

TNM	SG	TNM	SG	TNM	SG
IA1	97%	IIA	79%	IIIC	24%
IA2	94%	IIB	72%	IVA	23%
IA3	90%	IIIA	55%	IVB	10%
IB	87%	IIIB	44%		



**Figura 1. Supervivencia a 24 meses. A.** Curvas de supervivencia global (SG) en pacientes con CPCNP dependiendo del estadio (Goldstraw et al. 2016). **B.** Diferencias en supervivencia entre CPCNP y CPCP (figura modificada de (Siegel et al. 2021)).

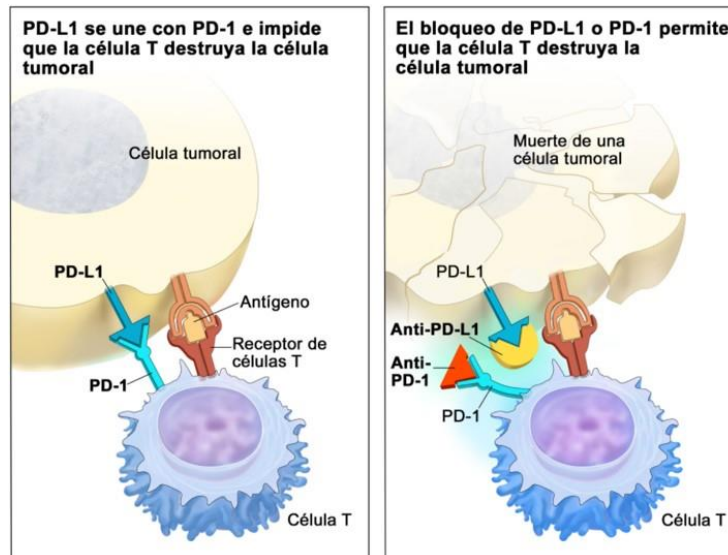


En cualquier caso, los resultados obtenidos con el tratamiento quimioterápico previo a la cirugía han sido desalentadores, ya que tan solo un 4% de pacientes consigue eliminar por completo el tumor (CPR, *complete pathological response*) (Crinò et al. 2010). A pesar de que la quimioterapia neo-adyuvante produce una supervivencia global (SG) a 2 años de 60% (Roth et al. 1994), no supera el 10% a largo plazo (5 años) (Ramnath et al. 2013).

Uno de los subgrupos en estadios intermedios de supervivencia más robustos ha sido la respuesta patológica. De este modo, pacientes con CPCNP tratados con quimioterapia con respuestas patológicas mayores (MPR, *major pathological response*) cuyo tumor remite más de un 90% presentan una SG a 5 años del 70%, en comparación con pacientes con respuestas patológicas incompletas (IPR, *incomplete pathological response*) cuya la remisión es menor del 90% donde la SG a 5 años es del 51% (Qu et al. 2019).

En los últimos años ha habido una eclosión de tratamientos en cáncer de pulmón con la incorporación de la inmunoterapia (Sharma y Allison 2015). Se entiende como inmunoterapia al uso de anticuerpos, terapias celulares, vacunas o moduladores del sistema inmunitario que promueven la activación de las células inmunológicas para favorecer la eliminación de las células tumorales (Cho 2017). Actualmente, las terapias basadas en el uso de anticuerpos monoclonales frente a proteínas de punto control inmunológico destacan sobre el resto por su gran desarrollo e implementación en el ámbito clínico (Wang et al. 2012).

En este trabajo se empleó el anticuerpo nivolumab (Opdivo) en combinación con quimioterapia. Este es un anticuerpo monoclonal cuya función es bloquear el receptor de muerte programada 1 (PD-1, *programmed death protein-1*) expresado en los linfocitos (Ishida et al. 1992) y células mieloides (Strauss et al. 2020). Este bloqueo impide la unión del receptor a sus ligandos (PD-L1 o PD-L2, *programmed death ligand 1 or 2*) en la célula tumoral, la cual sobreexpresa estos ligandos en el 40-50% de los pacientes con CPCNP (Johnson DH et al., 1996. J Clin Oncol).



**Figura 2. Mecanismo de acción de nivolumab (anti-PD-1).** Consiste en el bloqueo del receptor PD-1 de las células inmunitarias evitando la unión del mismo al ligando PD-L1 presente en las células tumorales favoreciendo así la destrucción de las mismas (Instituto Nacional del Cáncer 2021a).

Los tratamientos de bloqueo de puntos de control inmunológico (ICIs, *immunecheckpoint inhibitors*) mejoran la supervivencia libre de progresión (SLP) y la SG de pacientes con CPCNP estadios IV con respecto a la quimioterapia basada en platinos. Esto ocurre tanto en primera línea de tratamiento con expresión de PD-L1 > 50% y en combinación con quimioterapia con independencia de la expresión de PD-L1, así como en segunda línea tras progresión a quimioterapia (Wagner et al. 2020).

A día de hoy, la inmunoterapia como primera línea de tratamiento en cáncer de pulmón solo está aprobada en estadios metastásicos. Adicionalmente se administra en estadios IIIB después del tratamiento con quimioterapia como tratamiento de consolidación. Diferentes ensayos clínicos están evaluando su eficacia en estadios tempranos o localmente avanzados (Berghmans et al. 2020). Los primeros ensayos clínicos en evaluar la actividad antitumoral de la inmunoterapia neo-adyuvante en pacientes con estadios iniciales, tanto en monoterapia con anti-PD-1 (Forde et al. 2018) o combinada con quimioterapia utilizando anti-PD-L1 (Shu et al. 2020) y anti-PD-1 (Provencio et al. 2020), han descrito un beneficio en la tasa de respuestas patológicas de los pacientes.

### 1.1.4 Marcadores utilizados en la práctica clínica

Los marcadores clínicos pronósticos de supervivencia a largo plazo tras quimioterapia neo-adyuvante más utilizados en la resección quirúrgica son la disminución del tumor y grado de invasión (*down-staging*) y el porcentaje de respuesta patológica (Kirn et al. 1994). De hecho, un estudio reciente ha sugerido el uso de MPR como subrogado para predecir supervivencia después de quimioterapia neo-adyuvante en CPCNP (Qu et al. 2019).

La selección de biomarcadores moleculares que permitan identificar qué pacientes se beneficiarán del tratamiento de elección en estadios intermedios es controvertida (Mielgo-Rubio et al. 2020). A pesar de que la carga mutacional tumoral (TMB, *tumor mutational burden*) se asoció a la respuesta patológica con inmunoterapia neo-adyuvante en monoterapia (Forde et al. 2018), en pacientes tratados con quimio-inmunoterapia neo-adyuvante no se ha encontrado una asociación de la respuesta patológica con la expresión de PD-L1 (Shu et al. 2020) o la TMB (Provencio et al. 2020).

No existe uniformidad entre la expresión de PD-L1 o la TMB y la respuesta tumoral al tratamiento (Festino et al. 2016), posiblemente debido a otros factores que podrían influenciar en la respuesta de los pacientes como son la composición linfocitaria infiltrada en el tumor (Hanahan y Coussens 2012), la regulación a la baja del complejo mayor de histocompatibilidad (MHC, *major histocompatibility complex*) en las células tumorales, la anergia de las células T específicas contra el tumor (Kim and Chen 2016) o la composición del microbioma (Ren et al. 2020).

La ausencia de marcadores robustos en el nuevo escenario de inmunoterapia o quimio-inmunoterapia neo-adyuvante, terapias que modifican las células inmunitarias, hace más evidente la necesidad de una búsqueda de biomarcadores predictivos de la respuesta al tratamiento centrados en el sistema inmunitario (Gridelli et al. 2017), así como la combinación de éstos, con los marcadores tumorales predictivos ya establecidos PD-L1 o TMB (Wojas-Krawczyk y Kubiowski 2020).

## 1.2 Sistema inmunitario: linfocitos y funciones

El sistema inmunitario se encarga de la defensa frente a patógenos, bacterias o células tumorales mediante dos tipos de respuestas: la innata y la adaptativa. En estas respuestas participan numerosos factores y tipos celulares, entre ellos los linfocitos y los monocitos (Abul K. Abbas; Andrew H. Lichtman And Shiv Pillai 2018).

Los linfocitos presentes en la sangre periférica se clasifican mediante su función antitumoral y su grupo de diferenciación (CD, *cluster differentiation*) en:

- Los linfocitos o células B son los encargados de producir anticuerpos en la inmunidad humoral. Se caracterizan por la expresión de CD19<sup>+</sup> y representan el 5-20% de los linfocitos totales.
- Los linfocitos o células T son mediadores en la inmunidad celular y se clasifican en:
  - Los linfocitos T CD4<sup>+</sup> colaboradores (30-60% del total de linfocitos), caracterizados por la expresión de CD3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup>, son los encargados de estimular, mediante citoquinas, a las células CD8 o linfocitos B.
  - Los linfocitos T CD8<sup>+</sup> citotóxicos (15-40% del total de linfocitos), caracterizados por la expresión de CD3<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup>, son los encargados de reconocer y eliminar a las células infectadas o cancerosas.
  - Los linfocitos T citolíticos naturales, caracterizados por la expresión de CD3<sup>+</sup>CD56<sup>+</sup> (0-10% del total de linfocitos), son mediadores de la vigilancia tumoral y encargados de la destrucción de las células tumorales.
  - Los linfocitos T reguladores, caracterizados por la expresión de CD3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>FoxP3<sup>+</sup>, participan en la regulación de las respuestas inmunitarias y en la auto tolerancia. Estos linfocitos aparecen en porcentajes muy bajos en sangre periférica (2.9%) (Apoil et al. 2017).
- Las células asesinas naturales (NK, *natural killer*), caracterizadas por CD3<sup>-</sup>CD56<sup>+</sup> (2-30% del total de linfocitos), participan en la inmunidad innata, liberación de citoquinas y destrucción de células tumorales (Vivier et al. 2008).

Las células madre hematopoyéticas de la médula ósea se diferencian en el linaje monocito-macrófago mediante el factor estimulante de colonias de monocitos (M-CSF, *macrophages*

*colony stimulating factor*). Los monocitos, que representan el 2-4% de los leucocitos en sangre, se dividen en los siguientes subgrupos (Rodríguez Cortés 2017):

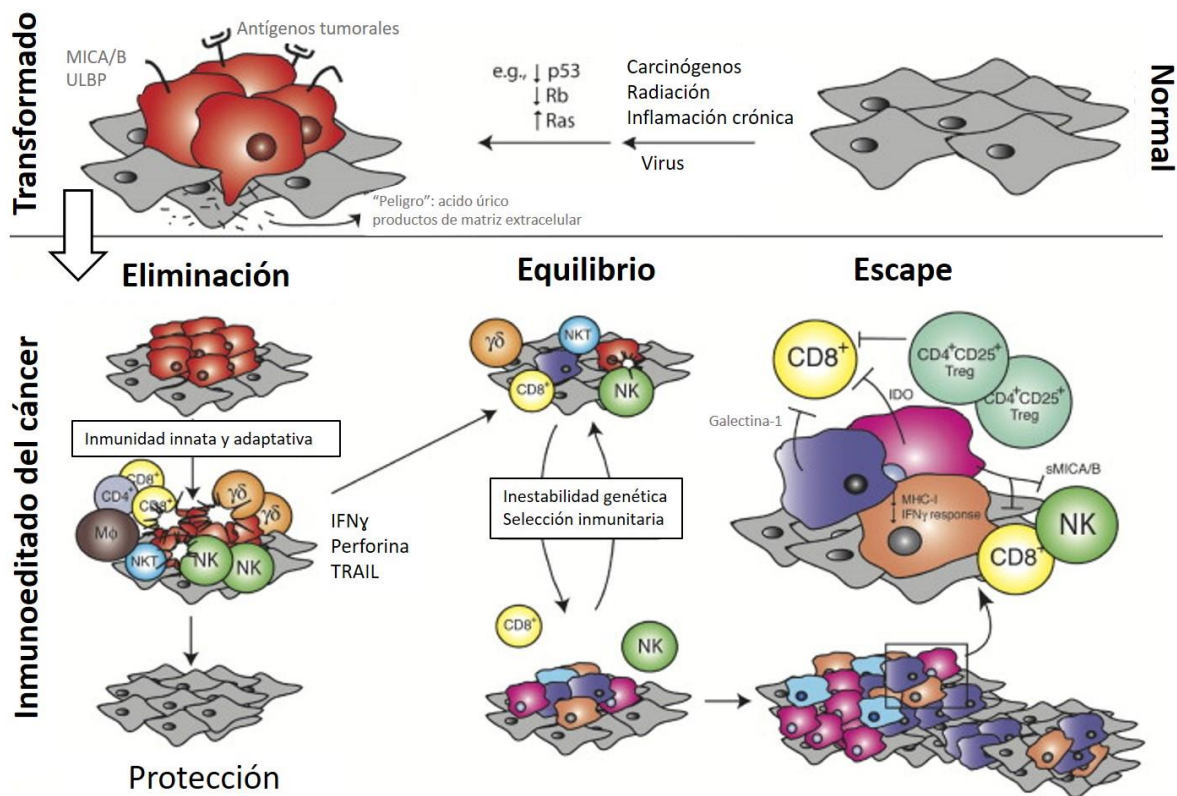
- Los monocitos clásicos (80-95%) son reclutados a los lugares de infección y su función principal es la fagocitosis. Se caracterizan por la elevada expresión de CD14 y la nula expresión de CD16 (CD14<sup>++</sup>CD16<sup>-</sup>).
- Los monocitos intermedios (2-11%) tienen funciones fagocíticas y proinflamatorias. Se caracterizan por la expresión alta de CD14 y la expresión intermedia de CD16 (CD14<sup>++</sup>CD16<sup>+</sup>).
- Los monocitos no clásicos (2-8%), mediante su función de patrullaje, contribuyen a la reparación del tejido tras la infección. Se caracterizan por la expresión baja de CD14 y CD16 (CD14<sup>+</sup>CD16<sup>+</sup>).

Los macrófagos se clasifican en M1 y M2 dependiendo de su función y activación. Los macrófagos clásicos (M1) se caracterizan por la producción de citoquinas proinflamatorias como IL-6, IL-12, IL-13, TNF- $\alpha$  y están implicados en procesos de fagocitosis. Los macrófagos activados alternativamente (M2) secretan IL-10 y TGF- $\beta$  implicados en la regulación de la inflamación, la reparación tisular y angiogénesis.

### 1.3 Microambiente tumoral

Las células tumorales cohabitan con diferentes células entre las que se encuentran macrófagos y linfocitos, denominados linfocitos infiltrantes del tumor (TILs, *tumor-infiltrating lymphocytes*), que estimulan respuestas inmunitarias específicas (Tuminello et al. 2019; Sheng et al. 2017). Las interacciones entre las células tumorales y las células inmunitarias generan un balance entre activación o inhibición de la respuesta inmunitaria. Cuando la respuesta inmunitaria está inhibida se considera que el tumor está evadiendo la misma y sería lo que conocemos como evasión tumoral. La evasión tumoral es una de las 3 fases en las que se divide la teoría de la inmunoección. Esta teoría trata de explicar las relaciones entre el sistema inmunitario y los tumores a lo largo de su evolución. De este modo, la inmunoección se puede dividir en tres pasos: eliminación, equilibrio y escape (figura 3) (Dunn, Old y Schreiber 2004). En la etapa de eliminación las células inmunitarias identifican y destruyen a las células tumorales, sin embargo, algunas células tumorales

pueden sobrevivir o incluso debido a las condiciones inflamatorias por la respuesta generada pueden aparecer nuevas células transformadas. Si las células tumorales sobreviven se produce la fase de equilibrio, en esta etapa es clave la actividad del sistema inmunitario adaptativo. Si se activan las células T efectoras se producirá la eliminación del tumor pero si por el contrario se activan las células T reguladoras, los macrófagos asociados a los tumores (TAMs) o diferentes factores inhibitorios se pasará a la etapa de escape donde las células tumorales suprimen al sistema inmunitario (Cho 2017).



**Figura 3. Inmunomodulación del cáncer** (modificado de (Dunn, Old y Schreiber 2004)). Se observa como la interacción de las células inmunitarias mediante diferentes receptores o factores solubles generan las diferentes fases de eliminación, equilibrio o escape del tumor.

### 1.3.1 Inmunidad antitumoral

Los linfocitos citotóxicos T CD8 pueden reconocer y eliminar a las células malignas que expongan péptidos derivados de antígenos tumorales asociados a MHC clase I (Schreiber, Old y Smyth 2011). El inicio de la respuesta antitumoral está mediado por las células

presentadoras de antígenos (APC, *antigen presenting cell*) que exponen en su superficie los péptidos derivados de los antígenos para su reconocimiento por los linfocitos T.

Las células APC se dirigen a los ganglios linfáticos donde producirán la activación de los linfocitos T CD4 cooperadores. Los linfocitos T CD4 también contribuyen a las respuestas antitumorales y en concreto los linfocitos Th1 han sido relacionados con un buen pronóstico. Los linfocitos Th1 potencian la respuesta de los linfocitos T CD8 y activan a los macrófagos mediante la secreción de interferón gamma (IFN- $\gamma$ ) y el factor de necrosis tumoral (TNF) (Fridman et al. 2012). La liberación de IFN- $\gamma$  puede activar, de manera clásica (M1), a los macrófagos infiltrados en el tumor favoreciendo la eliminación de las células tumorales. Además, los linfocitos T CD4 pueden expresar granzima B y por tanto tener actividad citotóxica que contribuiría a la muerte de las células tumorales (Gu et al. 2019).

Los macrófagos son APCs que presentan péptidos derivados de los antígenos a los linfocitos T para su activación y también pueden promover el crecimiento y propagación de las células cancerosas, pudiendo estar inhibidas mediante la expresión de PD-1 (Gordon et al. 2017).

Los linfocitos NK y T CD56<sup>+</sup> pueden eliminar células tumorales, así como participar en la vigilancia inmunitaria (Shimasaki, Jain y Campana 2020; Krijgsman, Hokland y Kuppen 2018; Nair y Dhodapkar 2017); y aunque se encuentran en una proporción baja en los infiltrados de tumores sólidos (Gillard-Bocquet et al. 2013) han sido descritos como un factor de buen pronóstico (Cózar et al. 2021). Aun así, las células tumorales pueden ser eliminadas por los linfocitos NK cuando reducen la expresión de MHC clase I o cuando aumentan los ligandos que se unen a receptores activadores de linfocitos NK. El receptor de linfocitos NK más común en los tumores es NKG2D (*natural killer group 2D*), que también expresan los linfocitos T CD8, T  $\alpha\beta$  y T CD56<sup>+</sup> (Groh et al. 2002). Éste receptor se une a 8 ligandos (MICA, MICB, ULBP1-6), los cuales solo se expresan en células que han sufrido estrés, células cancerígenas y en células infectadas con virus (Prajapati et al. 2018).

Las células B pueden contribuir también a la inmunidad antitumoral mediante la formación de estructuras terciarias en pacientes que responden al tratamiento de ICIs en melanoma (Helmink et al. 2020).

En cualquier caso, las respuestas inmunitarias no siempre impiden el crecimiento de tumores, dado que existen mecanismos especializados por parte de las células tumorales para evadir la respuesta del sistema inmunitario e incluso pueden favorecer el crecimiento tumoral mediante procesos de inflamación crónica, como en el caso de tumores sólidos (O'Donnell, Teng y Smyth 2019).

### 1.3.2 Mecanismos de evasión

Existen diferentes mecanismos por los cuales las células tumorales consiguen evadir el sistema inmunitario. Los principales mecanismos de evasión pueden clasificarse en inhibición activa de las respuestas inmunitarias antitumorales o la pérdida de los antígenos o moléculas MHC que dirigen estas respuestas (Drake, Jaffee y Pardoll 2006).

La inhibición activa de estas respuestas se produce mediante la expresión de ligandos que se unen a receptores inhibidores, como los puntos de control inmunitario, antígeno 4 del linfocito citotóxico (CTLA-4, *T-lymphocyte antigen-4*) o PD-1, de los linfocitos infiltrados en el tumor. Por lo tanto, el bloqueo de estas vías para revertir el fenotipo alterado de los linfocitos T y potenciar su capacidad de eliminar las células tumorales es el objetivo de numerosas terapias en cáncer (Pardoll 2012).

La unión de PD-1 con sus ligandos produce la inactivación de las células inmunitarias permitiendo así que las células tumorales evadan al sistema inmunitario (Hanahan y Weinberg 2011; O'Donnell, Teng y Smyth 2019) y evitando por tanto la destrucción del tumor por parte de los linfocitos T (Palucka y Coussens 2016) y B (Valenzuela-Membrives et al. 2016; Helmink et al. 2020), así como por los macrófagos (Lou et al. 2016), las células NK (Gharagozloo et al. 2015; Pesce et al. 2019) o las células T CD56<sup>+</sup> (Hakanen et al. 2018).

Otro ejemplo de un mecanismo que produce la inhibición activa de las respuestas es la activación alternativa de los macrófagos (M2) que liberan al medio el factor de crecimiento angiogénico VEGF (*vascular endothelial growth factor*) o el factor de crecimiento transformante beta (TGF- $\beta$ , *tumor growth factor beta*), favoreciendo la propagación y el crecimiento tumoral (Hofman 2020).



Por otro lado, las células dendríticas pueden dirigir la diferenciación de los linfocitos T CD4 en Th2 (antiinflamatorios) o en T reguladoras y las células mieloides supresoras (MDSC, *myeloid derived suppressor cells*) suprimen las respuestas inmunitarias de los linfocitos T frente a tumores (Senovilla et al. 2012). Estos mecanismos pueden ser revertidos con el uso de quimioterapia e inducir una respuesta antitumoral mediante la disminución del número de células T reguladoras y células T CD4 Th2 (Aldarouish et al. 2019).

El otro mecanismo de evasión mencionado es la pérdida de antígenos tumorales mediante nuevas mutaciones en los genes que codifican los mismos produciendo la expresión aberrante de neo antígenos tumorales o la pérdida de expresión por parte de MHC clase I (Wessolly et al. 2020), de manera que los linfocitos T CD8 citotóxicos no reconocen los antígenos tumorales. Aunque las células NK podrían eliminar a las células tumorales sin reconocimiento de los antígenos, el tumor desarrolla otro mecanismo de evasión para inhibir la acción de estas que consiste en la liberación de los ligandos para los receptores activadores de las células NK (Drake, Jaffee y Pardoll 2006).

Estos mecanismos de evasión tumoral fundamentan el uso de la inmunoterapia, ya sea mediante ICIs, vacunación con antígenos tumorales, el tratamiento con terapias celulares (CAR, *chimeric antigen receptors*) o el tratamiento con citoquinas entre otros. Pero aún con estos tratamientos, un porcentaje variable de los pacientes no responden o presentan resistencia tras una respuesta inicial. Esto puede deberse a múltiples causas, entre las que cabe destacar que exista un reducido número de mutaciones somáticas en el tumor, lo que genera pocos clones de linfocitos T específicos del tumor o que el tumor se encuentre infiltrado con células supresoras como las T reguladoras (Ren et al. 2020).

El desarrollo de mecanismos de evasión por parte de los tumores hace necesario el estudio del microambiente tumoral y su componente inmunitario tanto para descubrir nuevos mecanismos, que puedan dar lugar a nuevas terapias, como para identificar posibles biomarcadores predictivos de la respuesta antitumoral.

### 1.3.3 Biomarcadores inmunitarios emergentes

La búsqueda de biomarcadores inmunitarios se puede realizar tanto en biopsias de tejido mediante el análisis de los TILs, como en sangre periférica mediante los hemogramas, las células mononucleares periféricas (PBMCs, *peripheral blood mononuclear cells*) y los factores solubles en el plasma de los pacientes (Bodor, Boumber y Borghaei 2020).

A continuación se procederá a describir los biomarcadores inmunitarios emergentes, que han sido descritos en pacientes con CPCNP con estadios avanzados tratados con inmunoterapia, centrados en tipos de respuesta clínicas por imagen o supervivencia de los pacientes.

#### 1.3.3.1 Células inmunitarias infiltradas en tejido tumoral

En tejido se ha desarrollado una puntuación inmunológica basada en el número de linfocitos T memoria (CD45RO) y T CD8 en el borde de los tumores resecados. Tumores de colon con baja puntuación tenían altas probabilidades de recaer y generar metástasis (Galon et al. 2006). También se encontraron resultados similares en melanoma, donde niveles elevados de linfocitos T CD8, al diagnóstico, estaban asociados a una mejor respuesta clínica (Tumeh et al. 2014), así como de CD45RO (Ribas et al. 2016).

El uso de la puntuación inmunológica en CPCNP podría tener un valor predictivo de la respuesta (Tunger et al. 2019). Aunque se desconoce la composición celular exacta de los tumores de pulmón, se ha localizado infiltración de células T, tanto CD4 como CD8, linfocitos B y un pequeño porcentaje de macrófagos y células NK (Stankovic et al. 2018).

Adicionalmente, un mayor infiltrado inmunitario de células dendríticas, linfocitos NK, macrófagos M1, linfocitos T CD8 y linfocitos B tanto en tumor como en estroma, en los pacientes con CPCNP, está asociado a un mejor pronóstico. Por el contrario, la expresión de PD-L1 en el tumor y la presencia de macrófagos M2 y células T reguladoras en estroma está asociado a un peor pronóstico (Soo et al. 2018).

El biomarcador inmunitario más estudiado es la expresión de PD-1 por las células inmunitarias. Una densidad menor de TILs PD-1<sup>+</sup>, en pacientes con CPCNP tratados con anti-

PD-1, está asociado a una mayor supervivencia libre de enfermedad (Mazzaschi et al. 2018). Dentro de los TILs, se ha asociado de manera positiva la presencia de CD8<sup>+</sup>PD-1<sup>+</sup> (Thommen et al. 2018) y por el contrario de manera negativa la de CD4<sup>+</sup>PD-1<sup>+</sup> (Zappasodi et al. 2018), que además expresaban granzima B, indicativo de su potencial citotóxico (Gu et al. 2019).

### 1.3.3.2 Células inmunitarias en sangre periférica

El estudio de la sangre periférica es una técnica menos invasiva que las biopsias de tejido pulmonar, es fácil de obtener y puede reflejar el estado del sistema inmunitario periférico (Kim, Kim, and Shin 2020).

En los hemogramas de los pacientes metastásicos con CPCNP tratados con nivolumab se ha descrito que aquellos pacientes que presentan niveles altos de neutrófilos (Facchinetti et al. 2018), de los ratios de neutrófilo-linfocito (NLR), plaquetas-linfocito (PLR) (Diem et al. 2017) y mieloide-linfocito (Soyano et al. 2017), al diagnóstico, están asociados a peores SLP y SG. A partir de los datos de los hemogramas se realizó una puntuación inmunológica en sangre periférica denominada LIPI que utiliza niveles elevados del ratio derivado de NLR (dNLR) y de la enzima lactato deshidrogenasa (LDH). Se observó que pacientes con un LIPI mayor desarrollaban peores tasas de respuestas (Mazzaschi et al. 2020) y menores SLP y SG (Mezquita et al. 2018) en pacientes con CPCNP.

Al profundizar en las PBMC's, los pacientes con estadios avanzados de CPCNP tratados con anti-PD-1 que al diagnóstico presentaban niveles altos de CD8<sup>+</sup>PD-1<sup>+</sup> (Mazzaschi et al. 2019) o CD4<sup>+</sup>PD-1<sup>+</sup> (Inomata et al. 2019) tenían supervivencias más largas. La proliferación de estas células CD8<sup>+</sup>PD-1<sup>+</sup> debida al tratamiento con anti-PD-1 se considera esencial para desarrollar una respuesta inmunitaria frente al tumor (Kamphorst et al. 2017). Por el contrario, otros trabajos describen niveles altos de CD4<sup>+</sup>PD-1<sup>+</sup> como factor de mal pronóstico en pacientes con CPCNP tratados con quimioterapia o anti-PD-L1 (Zheng et al. 2016).

Con respecto a CTLA-4 no se observaron diferencias en los porcentajes de linfocitos T CD4 y T CD8 positivos para CTLA-4<sup>+</sup> en la sangre periférica de los pacientes con CPCNP tratados con anti-PD-1 (Inomata et al. 2019).

Aunque han sido poco investigadas en CPCNP, las células NK también parecen tener un valor predictivo. En un estudio definieron que la presencia de niveles elevados de células NK y células CD56<sup>dim</sup>NKG2D<sup>+</sup> parecía estar asociado a una mejor respuesta al tratamiento con nivolumab en pacientes con CPCNP (Mazzaschi et al. 2019).

Por último, pese a que las células T reguladoras podrían estar implicadas en el desarrollo del cáncer de pulmón (Hu et al. 2019; Duan et al. 2015), hay pocos estudios que definan la función de estas células en sangre periférica de pacientes con CPCNP, no observándose asociación de estas células con la respuesta al tratamiento neo-adyuvante basado en quimioterapia con anti-EGFR (Pircher et al. 2014).

#### 1.3.3.3 Factores solubles inmunitarios en sangre periférica

Existen numerosas citoquinas implicadas en las respuestas antitumorales: las pro-inflamatorias que potencian el efecto de la inmunoterapia, como son entre otras el IFN- $\alpha$ , las interleuquina (IL)-2, IL-15, IL-21, IL-10, IL-12 y el factor estimulante de colonias de granulocitos (GM-CSF, *granulocyte-macrophage colony stimulating factor*) y las antiinflamatorias que inhiben la actividad inmunitaria frente al tumor, como TNF- $\alpha$ , TGF- $\beta$ , MCSF, VEGF y citoquinas implicadas en promover las células mieloides como IL-8 o los ligando de quimioquinas (CCL)-2, CCL3 y CCL5 (Berraondo et al. 2019).

Además, la fracción soluble de CD137 (sCD137, también llamada 4-1BB), secretada principalmente por células T reguladoras, está implicada en la inhibición de la actividad de los linfocitos T y NK (Luu, Shao y Schwarz 2020). Por otro lado, IL-1b, TNF- $\alpha$  o IL-6, pueden favorecer el crecimiento tumoral, la angiogénesis y la metástasis, mediante el reclutamiento de TAMs y MDSC en el tumor y la secreción de VEGF por las células tumorales (Bent et al. 2018).

En otros tumores sólidos se ha demostrado el papel pronóstico desfavorable de la inmunoglobulina de célula T (sTIM-3), el gen 3 de activación de linfocitos (sLAG-3), sPD-L1, sPD-L2 y el atenuador de linfocitos T y B (sBTLA) en cáncer renal (Wang et al. 2019) y de sTIM-3 en osteosarcoma (Ge et al. 2017).

En plasma de pacientes con CPCNP estadio IV tratados con nivolumab se ha observado que, al diagnóstico, niveles bajos de granzima B están asociados a una peor SLP y SG, lo que sugiere un potencial mecanismo de resistencia al tratamiento anti-PD-1 (Hurkmans et al. 2020).

La solubilidad de los ligandos expresados por las células tumorales puede influir en las respuestas inmunológicas. De hecho, trabajos recientes han demostrado que niveles altos de sPD-L1 (Mazzaschi et al. 2020) o sMICA/B (Cascone et al. 2017) en pacientes con CPCNP tenían menores SLP y SG, y que podrían ser utilizados como marcadores de mal pronóstico. Sin embargo, una disminución del receptor de linfocitos sPD-1 después del tratamiento con nivolumab está asociado a una reducción de la SLP y SG (Meyo et al. 2020).

Por último, se ha descrito una relación entre la SLP de pacientes con CPCNP y ciertos factores solubles en plasma, como son GM-CSF, CXCL2, VEGF, IFN $\alpha$ 2 y la metaloproteinasa de matriz 2 (MMP2). Después del tratamiento con anti-PD1, niveles altos de MMP2 y bajos de CXCL2 reflejaban una mejor respuesta (Matsuo et al. 2019).

# Capítulo 2

## Hipótesis y objetivos

### 2 HIPÓTESIS Y OBJETIVOS DEL ESTUDIO

---

La hipótesis principal de este trabajo es que las células del sistema inmunitario podrían estar implicadas en la respuesta a quimio-inmunoterapia neo-adyuvante en pacientes con CPCNP estadios IIIA.

El objetivo principal es la búsqueda de biomarcadores asociados a respuesta patológica en tejido y en sangre periférica que permitan identificar qué pacientes se pueden o no beneficiar del tratamiento neo-adyuvante quimio-inmunoterápico.

Los objetivos intermedios son:

- Analizar el papel de la respuesta patológica como posible subrogado de supervivencia a 2 años.
- Estudiar la relación del fenotipo y los niveles de poblaciones celulares inmunitarias en sangre periférica, tanto al momento del diagnóstico como después del tratamiento neo-adyuvante, con la respuesta patológica.
- Caracterizar y relacionar la infiltración celular inmunitaria en tejido al momento del diagnóstico, así como después del tratamiento neo-adyuvante con la respuesta patológica.

- Identificar la asociación entre los niveles de citoquinas y factores solubles secretados en plasma, tanto al diagnóstico como al final del tratamiento neo-adyuvante con la respuesta patológica.

# Capítulo 3

## Material y métodos

### 3 MATERIAL Y MÉTODOS

---

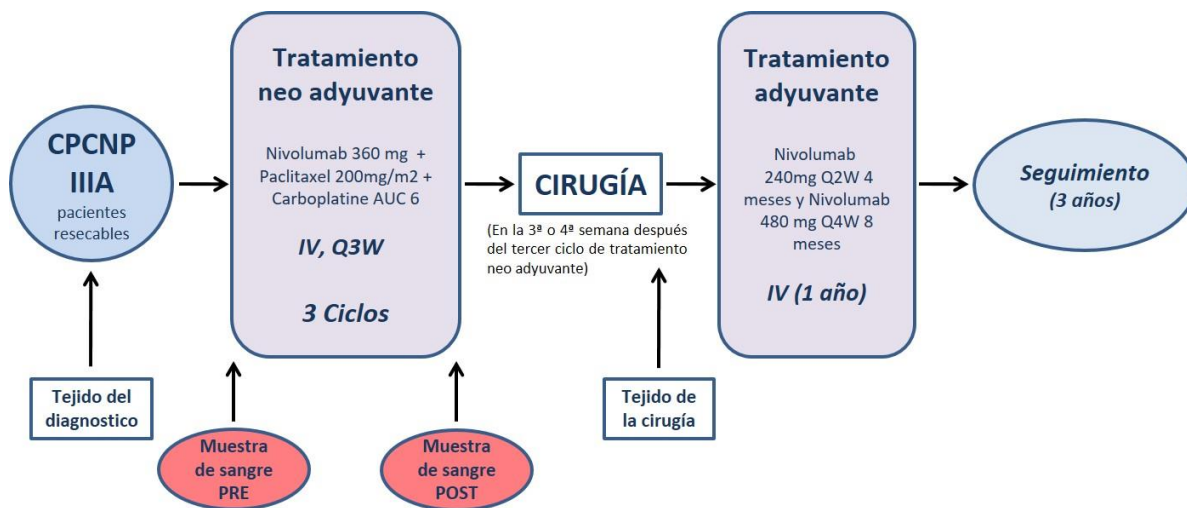
#### 3.1 Diseño del estudio

El estudio NADIM (Neo-Adjuvant Immunotherapy) es un ensayo clínico exploratorio y multicéntrico fase II, consistente en la administración de quimioterapia e inmunoterapia neo-adyuvante seguido de 1 año de tratamiento con inmunoterapia adyuvante (NCT03081689).

Los pacientes incluidos en 18 hospitales del territorio español fueron diagnosticados con estadio IIIA potencialmente resecable (7th edición de TNM) de CPCNP. Información extendida sobre las características clínicas, actividad antitumoral y seguridad del tratamiento se puede encontrar en el Anexo II (Provencio et al. 2020).

Como parte del trabajo traslacional, se analizaron muestras de sangre y tejido al diagnóstico y posterior al tratamiento neo-adyuvante como se indica en la figura 4.





**Figura 4. Esquema del ensayo clínico NADIM.** Se incluye dosis de tratamiento intravenoso (IV) y periodicidad (QW) indicando las semanas de administración del tratamiento. Por ejemplo, cada 3 semanas se representa como Q3W (*every 3 weeks*).

Se obtuvo la información clínica de los hemogramas de 46 pacientes al diagnóstico y post tratamiento neo-adyuvante, así como biopsia tumoral al diagnóstico de 40 pacientes y de los 41 operados post tratamiento neo-adyuvante. Debido al inicio de la tesis doctoral posterior al comienzo del ensayo clínico, solo se obtuvo acceso a muestras de sangre periférica de 30 pacientes antes del tratamiento neo-adyuvante y 34 pacientes con muestra post tratamiento neo-adyuvante. La disponibilidad de muestras se encuentra detallada en la Tabla 3.

**Tabla 3. Disponibilidad de muestras en cada técnica**

Técnica	Diagnóstico – Pre	Cirugía – Post
Hemogramas	46	46
Microambiente tumoral	40	41
Citometría de flujo	30	34
Factores solubles	30	34
Citoquinas	30	34

La determinación de la respuesta patológica se realizó de acuerdo a las guías clínicas estándar de rutina por los patólogos de los diferentes hospitales, con una confirmación posterior por dos patólogos del Hospital Universitario Puerta de Hierro-Majadahonda (HUPHM). Se utilizó la clasificación recomendada por la IASLC (Travis et al. 2020), distinguiendo así 3 grupos de respuesta patológica: CPR (0% de células tumorales viables),

MPR (menos del 10% de células tumorales viables) e IPR (más del 10% de células tumorales viables), tanto en el tumor primario como en los ganglios.

Para las diferentes variables analizadas y su relación con la respuesta patológica solo se utilizaron las muestras de aquellos pacientes operados, ya que no hay disponibilidad de dicha información en los pacientes que no recibieron cirugía. El efecto del tratamiento en las diferentes técnicas se realizó en todos los pacientes.

### 3.2 Hemogramas

El hemograma es la parte analítica que evalúa varios parámetros de la sangre periférica como son los glóbulos rojos, glóbulos blancos, plaquetas y factores de coagulación. Para su realización se extrajeron 5 mL de sangre en un tubo que utiliza el ácido etilendiaminotetraacético (EDTA) como anticoagulante y se procedió a la determinación en el hospital de procedencia del paciente. Posteriormente se recogieron los datos proporcionados por el Grupo Español de Cáncer de Pulmón (GECP) de cada hospital. Para una correcta interpretación del hemograma, se seleccionó una analítica de la misma fecha de extracción que la muestra de sangre periférica empleada para el fenotipado de células inmunitarias y factores solubles en plasma.

De todos los parámetros que proporcionan los hemogramas solo se utilizaron los detallados a continuación, indicando en cada uno de ellos, los valores establecidos como normales de los mismos: hemoglobina (12-17,5 g/dL), LDH (140-280 UI/L), plaquetas (150000-400000/mm<sup>3</sup>), leucocitos (4000-10000/mm<sup>3</sup>), neutrófilos (2000-7500/mm<sup>3</sup>), linfocitos (1500-4000/mm<sup>3</sup>), monocitos (200-800/mm<sup>3</sup>), eosinófilos (40-400/mm<sup>3</sup>) y basófilos (10-100/mm<sup>3</sup>).

A partir de estos datos se calcularon diferentes ratios descritos en la literatura:

$$\text{Ratio NLR} = \frac{\text{neutrófilos}}{\text{linfocitos}} \quad \text{Ratio dNLR} = \frac{\text{neutrófilos}}{\text{leucocitos} - \text{neutrófilos}}$$

$$\text{Ratio M:L} = \frac{\text{neutrófilos} + \text{eosinófilos} + \text{monocitos}}{\text{linfocitos}} \quad \text{Ratio PLR} = \frac{\text{plaquetas}}{\text{linfocitos}}$$

$$\text{Lipi Score} = dNLR > 3 \text{ (1 factor)} + LDH > 333 \text{ UI/L (1 factor)}$$

El Lipi score se calculó mediante la presencia o ausencia de los 2 factores indicados en la fórmula: la presencia de 0 factores (buen pronóstico), de 1 factor (pronóstico intermedio) y de 2 factores (mal pronóstico).

### 3.3 Inmunofluorescencia multiplexada en FFPE

Se recibieron 40 muestras de tejido al diagnóstico y 41 muestras de las cirugías provenientes de los diferentes hospitales que participaron en el ensayo clínico. De estas, 33 al diagnóstico y 39 de las cirugías contenían suficiente tejido para intentar realizar los ensayos moleculares. Se obtuvieron secciones de 4µm de los bloques FFPE utilizando un micrótomos HM325 (ThermoFisher). Una de las secciones se destinó a la realización de un control interno por parte del Departamento de Anatomía Patológica del HUPHM mediante la tinción con Hematoxilina-Eosina (H&E) donde 13 muestras al diagnóstico fueron válidas para realizar la determinación del microambiente tumoral con un número suficiente de linfocitos infiltrantes. Debido a las limitaciones del presupuesto, así como para equilibrar el número de individuos de los diferentes grupos de respuesta, se decidió realizar la técnica en 21 bloques de cirugía (9 CPR, 6 MPR, 6 IPR) seleccionando 34 muestras totales (tabla 4).

El análisis de los cortes se realizó en el Departamento de Patología Molecular Traslacional en el MD Anderson Cancer Center (Houston, Texas, USA) donde se escanearon los cortes de H&E utilizando el software Aperio Image Toolbox (Leica Biosystems). Tras un control interno de calidad, donde se determinó la existencia de artefactos al corte (modificando la disposición de las células en el tejido impidiendo su correcta valoración) así como la proximidad del corte al borde del cristal (lo que dificulta su tinción), 29 muestras de 20 pacientes cumplieron los criterios de inclusión (12 diagnósticas y 17 cirugías), 9 de las cuales tenían muestras pareadas (pre y post tratamiento).

**Tabla 4. Selección muestras para técnica inmunofluorescencia**

Centro	Tipo de selección	Diagnóstico	Cirugía
HUPHM	Muestras disponibles	40	41
	Tejido suficiente	33	39
	Número de células suficiente	13	39
	Presupuesto y distribución de respuestas patológicas	13	21
MD Anderson	Artefactos en cortes	12	17

Una vez seleccionadas las muestras válidas para la tinción multiplex, se procedió a la tinción de 2 secciones (una para cada panel de anticuerpos), como se ha descrito previamente (Parra et al. 2017). Para ello, los cortes se desparafinaron y se tiñeron de manera automática utilizando el Opal 7-color fIHC kit (PerkinElmer, Waltham, MA). Se realizó una primera incubación en solución de recuperador de antígeno que se llevó a ebullición 1 min (100 °C), las laminillas fueron incubadas durante 15 min a 75 °C, se dejaron enfriar durante 15 min y fueron lavadas con agua destilada. Posteriormente se incubaron entre 30 min y 2 horas dependiendo del anticuerpo primario, se lavaron e incubaron con el anticuerpo secundario 10 min. Después se incubaron 10 minutos con el fluorocromo de interés, se escanearon con el microscopio multiespectral Vectra y Polaris (PerkinElmer) y se analizaron en el programa de imágenes inForm (PerkinElmer).

Los anticuerpos utilizados por orden alfabético fueron: Pan-citoqueratina (AE1/AE3, Dako), CD3 (policlonal, Dako), CD8 (C8/144B, Thermo Fisher Scientific), CD45RO (UCHL1, Leica Biosystems), CD68 (PG-M1, Dako), DAPI, FOXP3 (206D, BioLegend), Granzima B (F1, Leica Biosystems), PD-1 (EPR4877-2, Abcam) y PD-L1 (E1L3N, Cell Signaling Technology). La positividad para el anticuerpo pan-citoqueratina se utilizó para diferenciar entre el compartimento del tumor y el estroma de las biopsias.

Los fenotipos analizados en Panel 1 fueron: células malignas totales o células epiteliales reactivas (CK<sup>+</sup>), células malignas o células epiteliales reactivas (CK<sup>+</sup>PD-L1<sup>+</sup>), células T totales (CD3<sup>+</sup>), células T citotóxicas (CD3<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup>), células T con experiencia antigénica (CD3<sup>+</sup>PD-1<sup>+</sup>), células T citotóxicas con experiencia antigénica (CD3<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup>PD-1<sup>+</sup>), células T PD-L1<sup>+</sup> (CD3<sup>+</sup>PD-L1<sup>+</sup>), células T con experiencia antigénica PD-L1<sup>+</sup> (CD3<sup>+</sup>PD-1<sup>+</sup>PD-L1<sup>+</sup>), células T citotóxicas con experiencia antigénica PD-L1<sup>+</sup> (CD3<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup>PD-1<sup>+</sup>PD-L1<sup>+</sup>), macrófagos totales (CD68<sup>+</sup>) y macrófagos totales PD-L1<sup>+</sup> (CD68<sup>+</sup>PD-L1<sup>+</sup>).

Los fenotipos analizados en Panel 2 fueron, células malignas totales o células epiteliales reactivas (CK<sup>+</sup>), células T totales (CD3<sup>+</sup>), células T citotóxicas (CD3<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup>), células T citotóxicas activadas (CD3<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup>GranzimaB<sup>+</sup>), células T memoria (CD3<sup>+</sup>CD45RO<sup>+</sup>), células T citotóxicas efectoras/memoria (CD3<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup>CD45RO<sup>+</sup>), células T reguladoras (CD3<sup>+</sup>FOXP3<sup>+</sup>, CD3<sup>+</sup>CD8<sup>-</sup>FOXP3<sup>+</sup>) y células T memoria/reguladoras (CD3<sup>+</sup>CD45RO<sup>+</sup>FOXP3<sup>+</sup>).

Debido a que las poblaciones CK<sup>+</sup>, CD3<sup>+</sup>, CD3<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup> son comunes en ambos paneles, se decidió utilizar las poblaciones obtenidas en el panel 1, debido a su proximidad con el corte donde se realizó la determinación patológica (Tabla 5).

**Tabla 5. Paneles utilizados en la inmunofluorescencia multiplexada**

<b>Color en análisis de imagen</b>	<b>PD-L1/PD-1 y panel de TILs (Panel 1)</b>	<b>Activación de células T (Panel 2)</b>
Rojo	CD3	CD3
Rosa	CD8	CD8
Verde	PD-1	FOXP3
Naranja	PD-L1	Granzima B
Amarillo	CD68	CD45RO
Azul cian	Pan citoqueratina	Pan citoqueratina
Azul oscuro	DAPI	DAPI

### 3.4 Procesamiento de muestras de sangre

Se recogieron 30 muestras de sangre periférica al diagnóstico y 34 muestras previas a la cirugía en tubos de 10 mL con EDTA en el hospital de referencia. Posteriormente se enviaron al HUPHM y se procesaron en las primeras 24 horas tras su recepción, para evitar el deterioro de las células inmunitarias presentes en la muestra, en una cabina de seguridad biológica (Telstar Bio IIA). Las muestras, previamente diluidas (1:1) con RPMI 1640, se procesaron mediante separación de las PBMCs por gradiente de densidad utilizando Lymphoprep TM (Stemcell) centrifugando sin freno a 1200rpm (270g) durante 25 minutos (SL16R Thermo Scientific). Las células fueron recogidas en RPMI 1640 para su lavado y conteo y el plasma fue almacenado a – 80 °C para su uso posterior.

El conteo celular se realizó de forma manual a través de microscopía óptica (Nikon TMS) utilizando una cámara de Neubauer. Se utilizaron 10 µl de muestra teñidos con 10 µl de Trypan-blue, para realizar el conteo únicamente de las células vivas. Tras el recuento las células se congelaron en 1 mL de medio de congelación (FBS/RPMI 10% DMSO) en viales de 3-5 x10<sup>6</sup> células en nitrógeno líquido.

### 3.5 Protocolo de tinción celular para citometría de flujo

Para valorar el fenotipo de las células inmunitarias, debido a la heterogeneidad natural que se puede encontrar en los marcadores entre diferentes individuos, se analizaron

exclusivamente los pacientes que presentaban muestras al diagnóstico y post tratamiento pareadas (perdiéndose 4 muestras post tratamiento). Además, debido a la posible variabilidad y viabilidad de las células se decidió utilizar exclusivamente las muestras procesadas en las primeras 24 horas tras su extracción (perdiéndose 1 paciente). El total de muestras procesadas para citometría de flujo fueron 58 (29 pacientes).

Las PBMCs fueron descongeladas en 5 mL de FACS Buffer (PBS 1X + 5% FBS) para lavar el medio de congelación y se repartieron en 5 tubos (4 paneles + blanco). Tras una centrifugación a 300g durante 5 minutos, se re-suspendieron en 50 µl de FACS buffer (blanco) o 50 µl del panel a estudiar usando las diluciones descritas más adelante. Las muestras se incubaron durante 30 minutos a 4 °C en oscuridad. Una vez pasado el periodo de incubación se procedió al lavado de las muestras mediante la adición de 300 µl de FACS buffer y el centrifugado de las mismas a 300g durante 3 minutos, posteriormente se decantó el sobrenadante y se añadieron 300 µl de PBS 1X. Justo en el momento de la adquisición en el citómetro de flujo se añadió 1 µl de DAPI.

Se realizó una titulación de anticuerpos, previa a la realización del ensayo, para evitar sesgos en la expresión de los receptores. Para ello se realizó la tinción de una muestra usando diferentes diluciones (1:10, 1:20, 1:50, 1:100 y 1:200) y se comparó con la misma muestra sin tinción (blanco). Se eligió la menor concentración que, indicando positividad del anticuerpo, se diferenciaba del blanco. Los paneles utilizados están especificados en la Tabla 6.

**Tabla 6. Diseño paneles citometría utilizados para el inmunofenotipado**

<b>Fluorocromo</b>	<b>Panel 1 – NK</b>	<b>Panel 2 – NK</b>	<b>Panel 3- T/B</b>	<b>Panel 4 – T</b>
PerCP	CD3	CD3	CD3	CD3
APC-Vio770	CD56	CD56	CD8	CD8
Viogreen	CD16	CD16	CD4	CD4
FITC	CD107a	CD69	CD19	CD69
PE	CTLA-4	NKG2D	CTLA-4	NKG2D
APC	CD14	CD14	CD14	CD14
Pe-Vio770	NKp44	PD-1	CD25	PD-1

Los anticuerpos utilizados fueron, por orden alfabético: CD3-PerCP (dilución 1:50, BW264), CD4-Viogreen (dilución 1:50, REA623), CD8-APC-Vio770 (dilución 1:50, BW135/80), CD14-APC (dilución 1:100, Tük4), CD16-Viogreen (dilución 1:50, REA423), CD19-FITC (dilución 1:50,

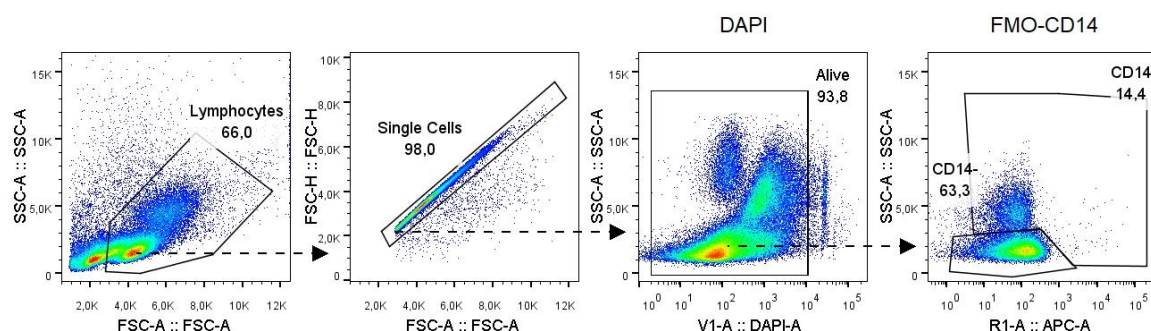
LT19), CD25-PE-Vio770 (dilución 1:20, M-A251), CD56-APC-Vio770 (dilución 1:50, REA196), CD69-FITC (dilución 1:50, REA824), CD107a (LAMP-1)-FITC (dilución 1:20, H4A3), CD152 (CTLA-4)-PE (dilución 1:20, BNI3), CD279 (PD-1)-PE-Vio770 (dilución 1:50, PD1.3.1.3), CD314 (NKG2D)-PE (dilución 1:100, REA797), CD336 (NKp44)-PE-Vio770 (dilución 1:20, clon 2.29) y DAPI (dilución 1:300, ThermoFisher). Todos los anticuerpos fueron proporcionados por Miltenyi Biotec, excepto CD25 (BD Bioscience).

Las muestras fueron analizadas mediante citometría de flujo utilizando el citómetro MACS Quant (Miltenyi), que permite la medición de 10 parámetros fenotípicos. Se grabaron un mínimo de 100000 eventos de linfocitos vivos y su posterior análisis se realizó utilizando FlowJo V10 software (BD Bioscience).

### 3.5.1 Estrategia de análisis de poblaciones inmunitarias en sangre periférica

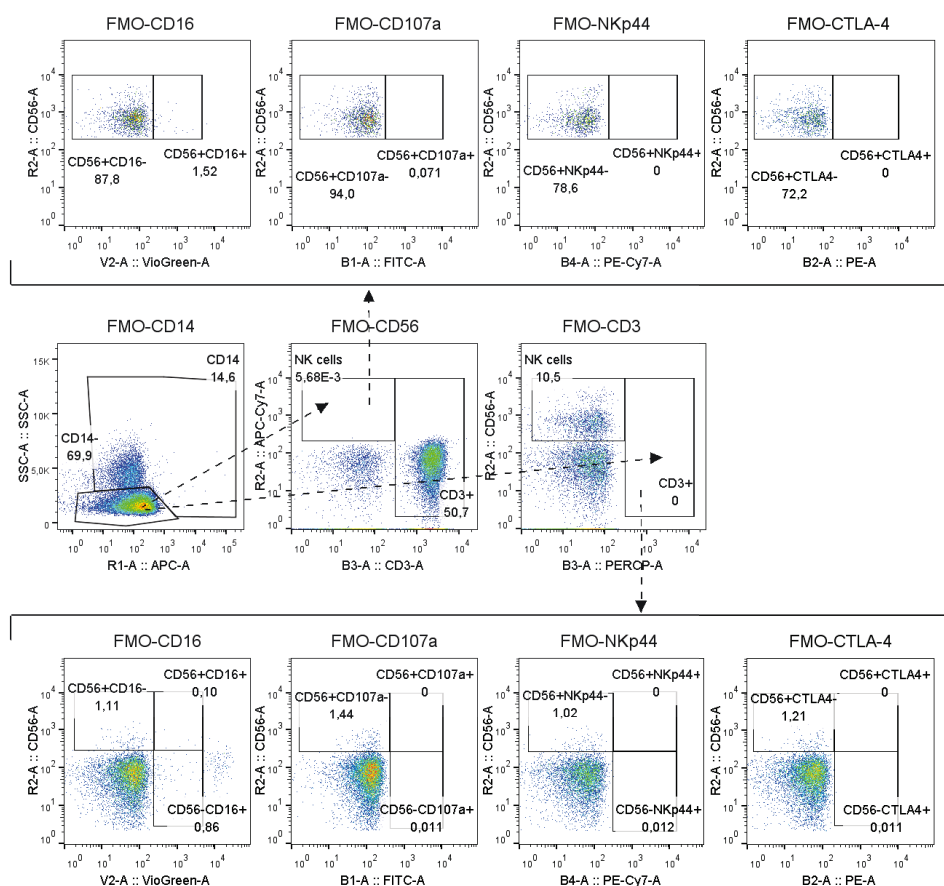
Para elegir la estrategia de análisis correcta de las poblaciones inmunitarias por citometría de flujo se realizaron FMOs (del inglés, *fluorescence minus one*) de todos los marcadores. Este análisis consiste en teñir las muestras con todos los fluorocromos de cada panel menos uno (el de interés) para determinar el límite entre señal positiva y negativa del mismo.

El análisis inicial en todos los paneles consistió en seleccionar únicamente células con un tamaño y una complejidad compatible con linfocitos o monocitos. Posteriormente se eliminaron los dobletes y las células muertas (DAPI<sup>+</sup>) y con el marcador CD14 se diferenció entre linfocitos (CD14<sup>-</sup>) y monocitos (CD14<sup>+</sup>) (figura 5).



**Figura 5. Estrategia de análisis inicial común a los 4 paneles de citometría.** Se seleccionaron los linfocitos mediante SSC-A (complejidad) vs FSC-A (tamaño), se eliminó del análisis los dobletes usando FSC-H (altura) y FSC-A (área). Se descartaron las células muertas (DAPI<sup>+</sup>) y posteriormente se diferenció entre CD14<sup>-</sup> y CD14<sup>+</sup>.

En el panel 1 se diferenció entre células NK ( $CD14^-CD3^-CD56^+$ ), células T ( $CD14^-CD3^+CD56^-$ ) y células T  $CD56^+$  ( $CD14^-CD3^+CD56^+$ ). En las células NK se seleccionó la positividad o negatividad para los diferentes marcadores de activación como CD16 (citotoxicidad), CD107a (degranulación), NKp44 (citotoxicidad) y el receptor de inhibición CTLA-4 (experiencia antigénica). En las células T se produjo la comparación de cada marcador previamente descrito en las células NK frente al marcador CD56. De esta manera se obtuvo positividad y negatividad de los marcadores de activación tanto en la población  $CD56^-$  (células T) como en la  $CD56^+$  (células T  $CD56^+$ ) (figura 6).

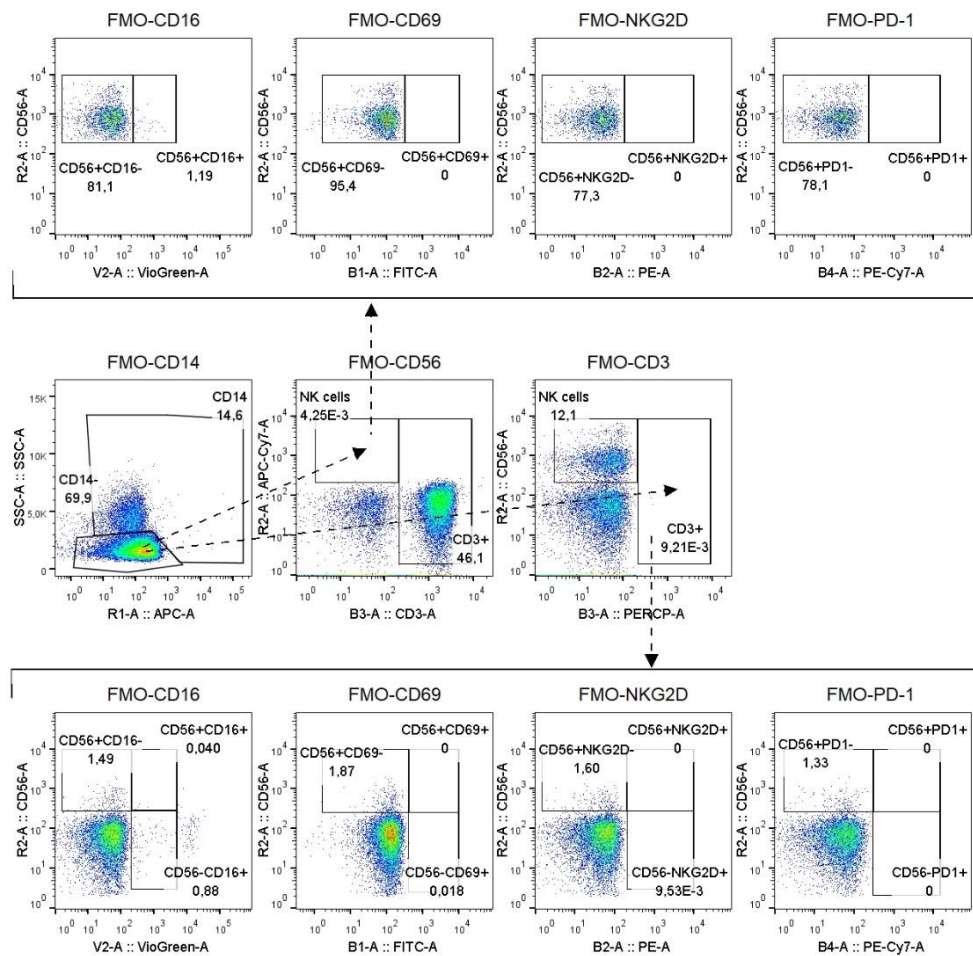


**Figura 6. Estrategia de análisis de células NK y células T del panel 1.** A partir de la población  $CD14^-$  se seleccionaron los linfocitos T ( $CD3^+$ ) y las células NK ( $CD3^-CD56^+$ ). Después se analizó la activación de ambos tipos celulares mediante CD16, CD107a, CTLA-4 y NKp44.

En el panel 2 se diferenció entre células NK ( $CD3^-CD56^+$ ) y células T ( $CD3^+$ ) de la misma manera que en el panel 1. En las células NK se seleccionó la positividad o negatividad para los diferentes marcadores de activación como CD16 (citotoxicidad), CD69 (activación),



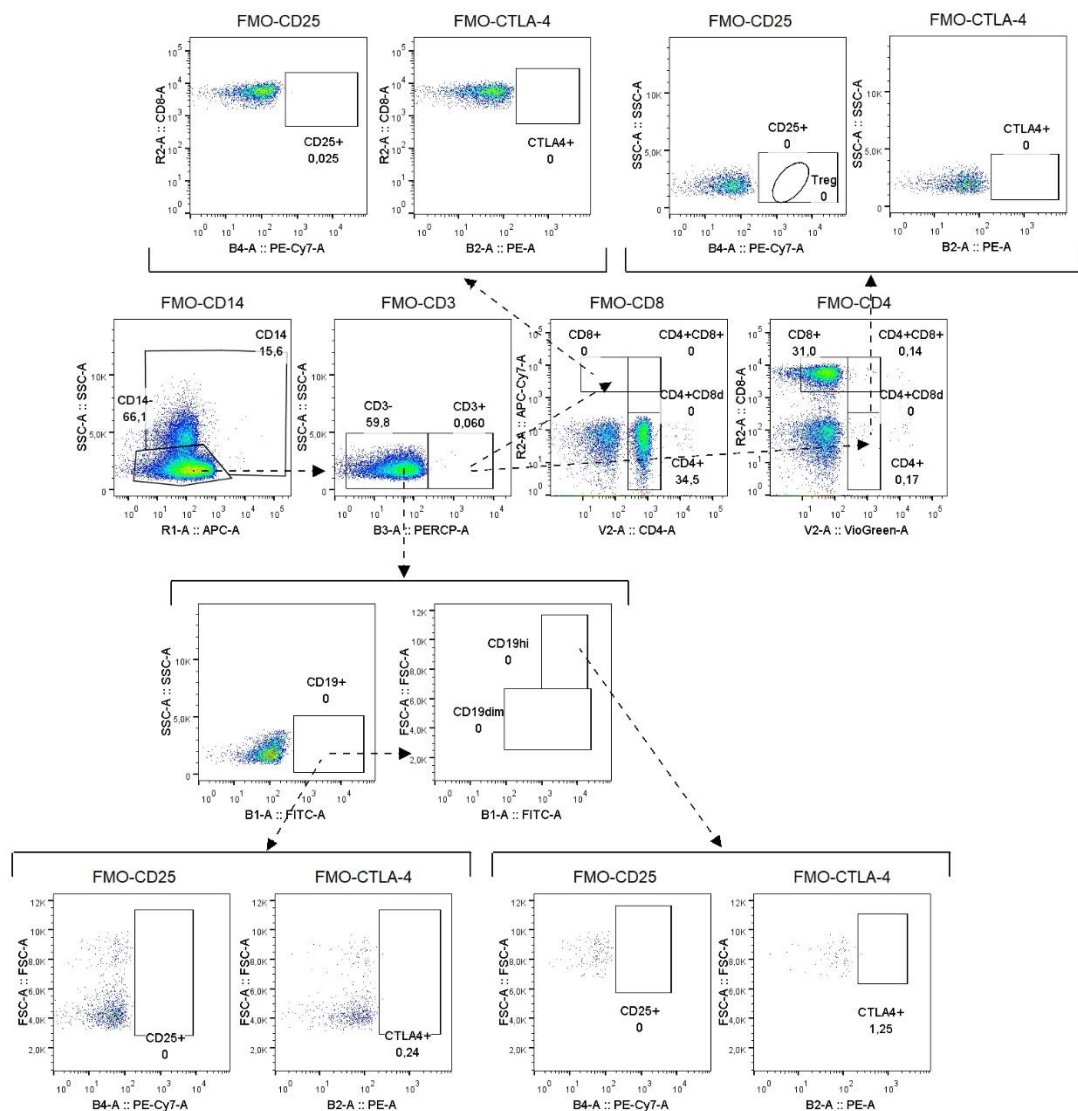
NKG2D (activación) y el receptor de inhibición PD-1 (experiencia antigénica). En las células T se realizó el mismo análisis descrito previamente para el panel 1 (figura 7).



**Figura 7. Estrategia de análisis de células NK y células T del panel 2.** A partir de la población CD14<sup>-</sup> se seleccionaron los linfocitos T (CD3<sup>+</sup>) y las células NK (CD3<sup>-</sup>CD56<sup>+</sup>), después se analizó la activación de ambos tipos celulares mediante CD16, CD69, NKG2D y PD-1.

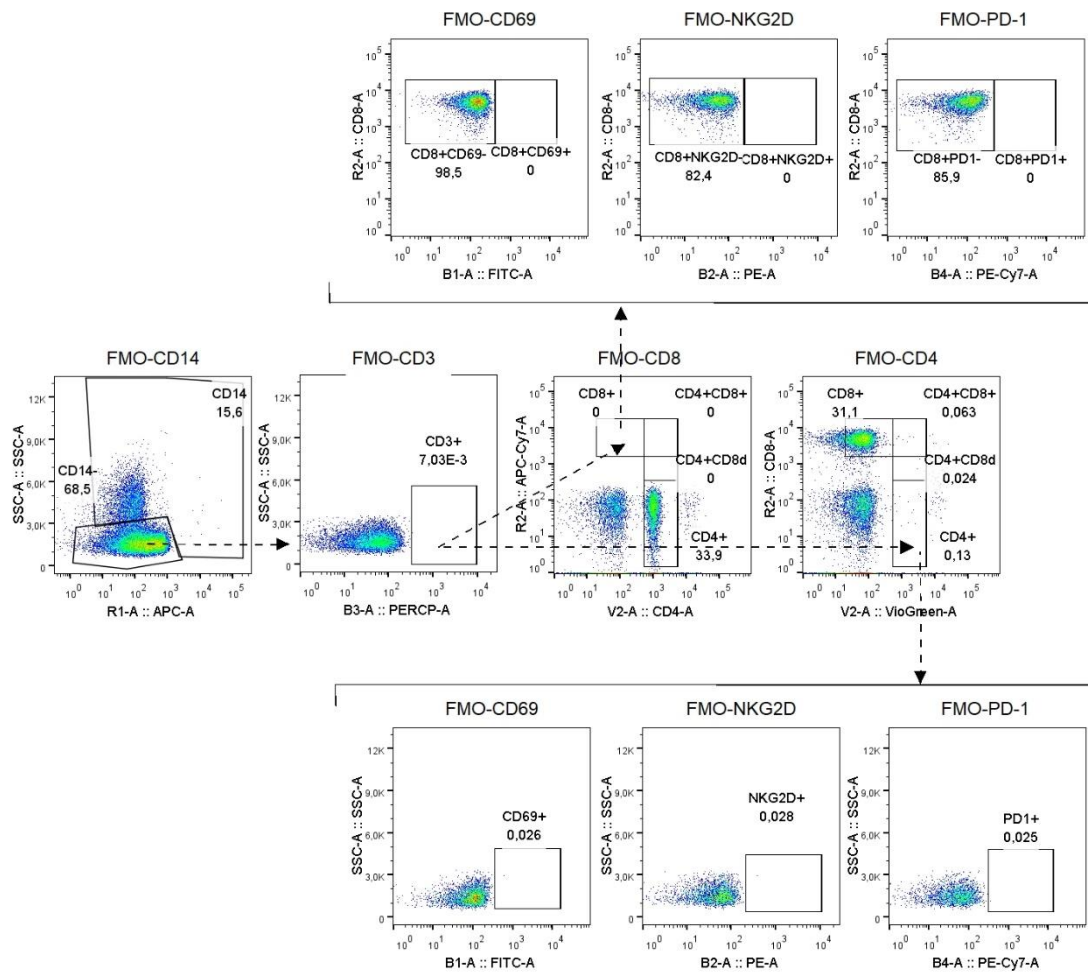
En el panel 3 se estudiaron las células T (CD3<sup>+</sup>) y B (CD3<sup>-</sup>CD19<sup>+</sup>). En primer lugar se seleccionó la población CD3<sup>+</sup>, posteriormente se enfrentó el marcador CD4 y CD8 para obtener las células T colaboradoras CD4 (CD8<sup>-</sup>CD4<sup>+</sup>) y las células T citotóxicas (CD4<sup>-</sup>CD8<sup>+</sup>). También se incluyó el análisis de células dobles positivas (CD4<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup>) y una subpoblación de estas con una intensidad menor de CD8 (CD4<sup>+</sup>CD8<sup>d</sup>). Posteriormente se detalló la expresión del marcador CTLA-4 en las células T CD4 y CD8, así como el marcador CD25 (activación) que en las células CD4 además se utilizó para seleccionar posibles células T reguladoras (CD4<sup>+</sup>CD25<sup>hi</sup>). Adicionalmente, debido a los resultados en los primeros pacientes, se realizó

un análisis en la población de células B con un tamaño mayor y con una expresión de CD19 mayor ( $CD19^{hi}$ ). En ambas poblaciones se analizó la positividad de CTLA-4 y CD25 (figura 8).



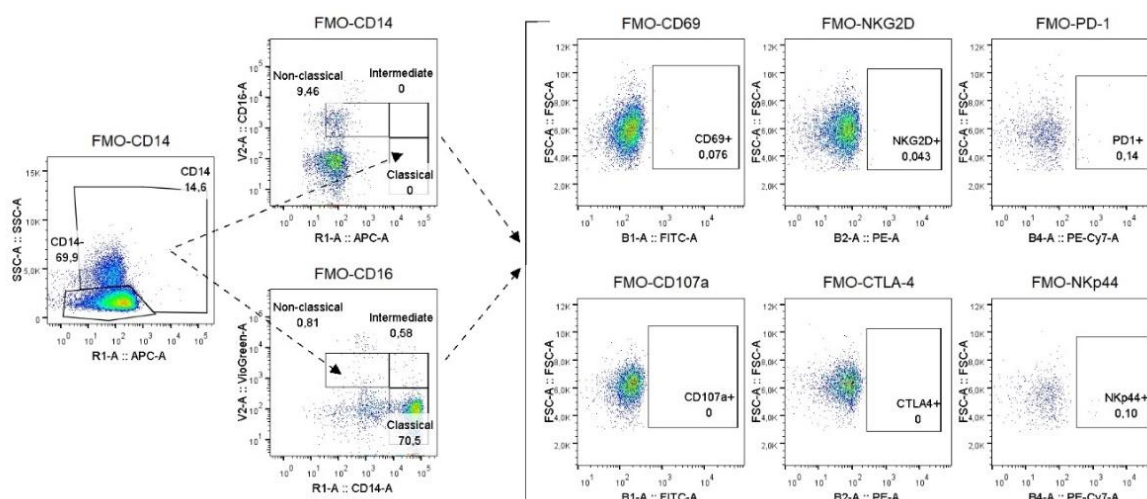
**Figura 8. Estrategia de análisis de células T y B del panel 3.** A partir de la población  $CD14^-$  se seleccionaron los linfocitos T ( $CD3^+$ ) en  $CD4^+$  y  $CD8^+$ , así como los linfocitos B ( $CD3^-CD19^+$ ), después se analizó la activación de cada tipo celular mediante CTLA-4 y CD25.

En el panel 4 se estudió la activación de las células T  $CD4^+$  y  $CD8^+$ . Como se ha mencionado en el panel 3, se seleccionaron las células  $CD4^+$ ,  $CD8^+$ ,  $CD4^+CD8^d$  y  $CD4^+CD8^+$  y posteriormente en cada una de ellas los marcadores de activación CD69, NKG2D y el receptor PD-1 (figura 9).



**Figura 9. Estrategia de análisis de células T del panel 4.** A partir de la población CD14<sup>-</sup> se seleccionaron los linfocitos T (CD3<sup>+</sup>) en CD4<sup>+</sup> y CD8<sup>+</sup>, después se analizó la activación de ambos tipos celulares mediante CD69, NKG2D y PD-1.

Para finalizar, se realizó el estudio de los monocitos empleando los paneles 1 y 2. Una vez se seleccionaron las células CD14<sup>+</sup>, para realizar la clasificación de los monocitos, se enfrentó CD14 con CD16 y así se obtuvieron los monocitos clásicos (CD14<sup>++</sup>CD16<sup>-</sup>), monocitos intermedios (CD14<sup>++</sup>CD16<sup>+</sup>) y los no clásicos (CD14<sup>+</sup>CD16<sup>+</sup>). Finalmente se profundizó en los marcadores de activación y receptores en cada subpoblación de monocitos (figura 10).

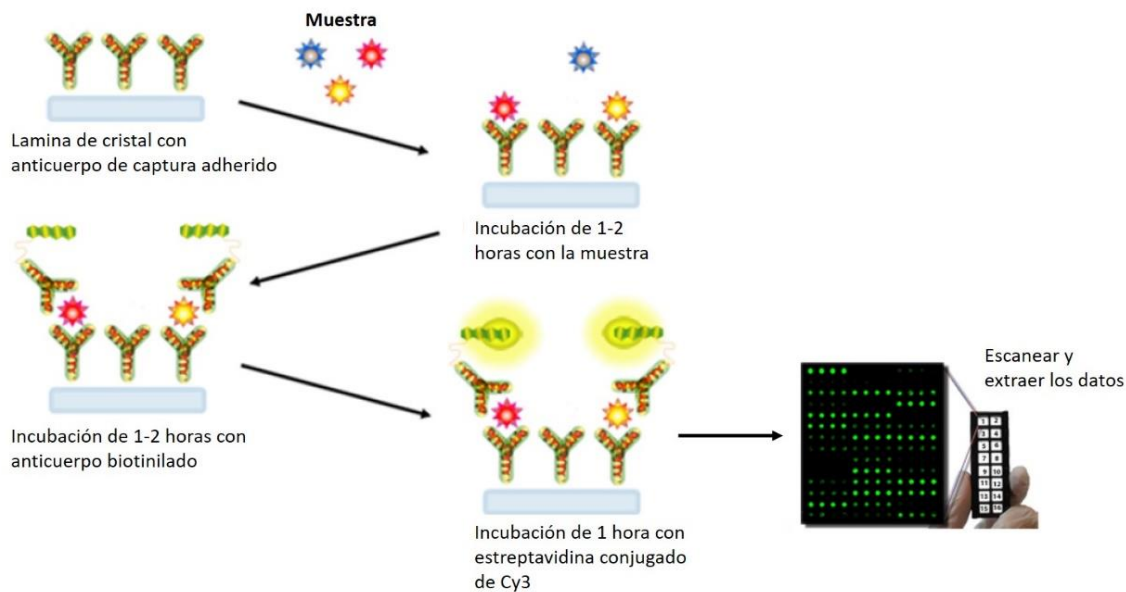


**Figura 10. Estrategia de análisis de monocitos usando el panel 1 y 2.** A partir de la población CD14<sup>+</sup> se seleccionaron los monocitos clásicos (CD14<sup>++</sup>CD16<sup>-</sup>), monocitos intermedios (CD14<sup>++</sup>CD16<sup>+</sup>) y los no clásicos (CD14<sup>+</sup>CD16<sup>+</sup>), después se analizó la activación de los tipos celulares mediante CD69, NKG2D, PD-1, CD107a, CTLA-4 y NKp44.

Debido al uso del anticuerpo anti-PD-1 (clon PD-1.3.1.3) la detección de células PD-1<sup>+</sup> post tratamiento neo-adyuvante, no fue posible (Zelba et al. 2018).

### 3.6 Factores solubles y citoquinas

Se utilizó el plasma de 30 muestras al diagnóstico y 34 muestras post tratamiento. Para la determinación de las citoquinas solubles en plasma se usó el de G-Series Human Cytokine Antibody Array 4000 de Ray Biotech. Este kit utiliza la combinación de 5 arrays para medir la expresión relativa de 200 citoquinas humanas que participan en inmunidad, apoptosis, angiogénesis, crecimiento celular y diferenciación (CAT: GSH-CAA-4000). La metodología del array está detallada en la figura 11 y las 200 citoquinas estudiadas medidas por cuadruplicado en las tablas 7A y 7B.



**Figura 11. Metodología del array de citoquinas.** Modificado del protocolo original (GSH-CAA-4000).

**Tabla 7A. Citoquinas estudiadas en el plasma de los pacientes con CPCNP**

Array 1 - QAH-IFN-3			Array 2 - QAH-GF-1			Array 3- QAH-CHE-1		
POS1	POS2	BLC (CXCL13)	POS1	POS2	Amphiregulin (AR)	POS1	POS2	6Ckine (CCL21)
Eotaxin-1 (CCL11)	Eotaxin-2 (MPIF-2)	G-CSF	BDNF	bFGF	BMP-4	Axl	Betacellulin (BTC)	CCL28 (MEC)
GM-CSF	I-309 (TCA-3/CCL1)	ICAM-1 (CD54)	BMP-5	BMP-7	beta-NGF	CTACK (CCL27)	CXCL16	ENA-78 (CXCL5)
IFN-gamma	IL-1 alpha	IL-1 beta	EGF	EGFR	EG-VEGF (PK1)	Eotaxin-3 (CCL26)	GCP-2 (CXCL6)	GRO
IL-1 ra (IL-1 F3)	IL-2	IL-4	FGF-4	FGF-7 (KGF)	GDF-15	HCC-1 (CCL14)	HCC-4 (CCL16)	IL-9
IL-5	IL-6	IL-6 R	GDNF	Growth hormone (GH)	HB-EGF	IL-17F	IL-18 BP alpha	IL-28A
IL-7	IL-8 (CXCL8)	IL-10	HGF	IGFBP-1	IGFBP-2	IL-29	IL-31	IP-10 (CXCL10)
IL-11	IL-12 p40	IL-12 p70	IGFBP-3	IGFBP-4	IGFBP-6	I-TAC (CXCL11)	LIF	LIGHT (TNFSF14)
IL-13	IL-15	IL-16	IGF-1	Insulin	MCSFR	Lymphotoctin	MCP-2 (CCL8)	MCP-3 (CCL7)
IL-17A	MCP-1 (CCL2)	M-CSF	NGFR (TNFSR16)	NT-3	NT-4	MCP-4 (CCL13)	MDC (CCL22)	MIF
MIG (CXCL9)	MIP-1 alpha (CCL3)	MIP-1 beta (CCL4)	Osteoprotegerin (OPG)	PDGF-AA	PLGF (PIGF)	MIP-3 alpha	MIP-3 beta	MPIF-1 (CCL23)
MIP-1 delta (CCL15)	PDGF-BB	RANTES (CCL5)	SCF	SCF-R (CD117)	TGF-alpha	MSPa	NAP-2 (CXCL7)	Osteopontin (OPN)
TIMP-1	TIMP-2	TNF-alpha	TGF-beta 1	TGF-beta 3	VEGF (VEGF-A)	PARC (CCL18)	Platelet Factor 4 (PF4)	SDF-1 alpha
TNF-beta	TNF-RI	TNF-RII	VEGF-R2	VEGF-R3	VEGF-D	TARC (CCL17)	TECK (CCL25)	TSLP

**Tabla 7B. Citoquinas estudiadas en el plasma de los pacientes con CPCNP**

Array 4 - QAH-REC-1			Array 5 - QAH-CYT-4		
POS1	POS2	4-1BB (CD137)	POS1	POS2	Activin A
ALCAM (CD166)	CD80 (B7-1)	BCMA (TNFRSF17)	AgRP	Angiogenin (ANG)	Angiopoietin-1 (ANG-1)
CD14	CD30 (TNFRSF8)	CD40 Ligand	Angiostatin	Cathepsin S	CD40
CEACAM-1	DR6 (TNFRSF21)	Dtk	Cripto-1	DAN	DKK-1
Endoglin (CD105)	ErbB3	E-Selectin	E-Cadherin	TROP1 (EpCAM)	Fas Ligand (TNFSF6)
Fas	Flt-3 Ligand	GITR (TNFRSF18)	Fc gamma RIIB/C	Follistatin	Galectin-7
HVEM (TNFRSF14)	ICAM-3 (CD50)	Contactin-2	ICAM-2 (CD102)	IL-13 R1	IL-13 R2 alpha
IL-1 R1	IL-2 R gamma	IL-10 R beta	IL-17B	IL-2 R alpha	IL-2 R beta
IL-17 RA	IL-21 R	LIMPII	IL-23	LAP/TGF beta 1	NrCAM
Lipocalin-2 (NGAL)	L-Selectin (CD62L)	LYVE-1	PAI-1	PDGF-AB	Resistin
MICA	MICB	NRG1-beta1	SDF-1 beta	gp130	Shh-N
PDGF R beta	PECAM-1 (CD31)	RAGE	Singlec-5 (CD170)	ST-2 (IL-1 R4)	TGF beta 2
TIM (KIM-1)	TRAIL R3	Trappini-2	Tie-2	Thrombopoietin (TPO)	TRAIL R4
uPAR	VCAM-1	XEDAR	TREM-1	VEGF-C	VEGF R1

Por otro lado, la medición de los 16 factores solubles en plasma se realizó mediante el panel Human Immuno-Oncology checkpoint protein panel de Milliplex (HCKPMAG-11K). Este panel incluye la medición de BTLA, CD27, CD28, CD40, CD80, CD86, CTLA-4, GITR, GITRL, HVEM, ICOS, LAG-3, PD-1, PD-L1, TIM-3 y TLR-2. En primer lugar, se procedió al lavado del plato de 96 pocillos con solución de lavado durante 10 minutos, se decantó y se añadieron los estándares, las muestras y las esferas magnéticas que incubaron entre 16-18 horas. Posteriormente se lavaron y se añadieron los anticuerpos de detección, se incubó 1 hora y después se añadió la streptavidina-PE. Se incubó durante 30 minutos, se lavó y se procedió a la lectura en Luminex 200 (Rafer).

### 3.7 Estadística

La investigación se diseñó como un trabajo de descubrimiento utilizando numerosas variables moleculares por lo que los p-valores no se ajustaron para maximizar el hallazgo de nuevos biomarcadores y la generación de nuevas hipótesis. Debido al tamaño muestral del estudio, se consideran los datos no ajustados a una normalidad y por tanto se realizaron análisis estadísticos no paramétricos usando el software IBM SPSS Statistics V25. El efecto del tratamiento de muestras pareadas se realizó mediante la prueba de rangos con signo de Wilcoxon (variación pre tratamiento *versus* post tratamiento en todas las determinaciones). Para las comparaciones de variables cuantitativas entre tres o más grupos independientes se utilizó el test de Kruskal-Wallis con ajuste de Bonferroni (hemogramas y multiplex) y para comparaciones entre 2 grupos de respuesta independientes se utilizó el test de Mann-Whitney (citometría de flujo y factores solubles en plasma). Para variables cualitativas se

realizaron tablas de contingencia utilizando el test de Chi cuadrado de Pearson. Para la valoración predictiva de los marcadores se utilizó el análisis de curvas de característica operativa del receptor (ROC, *Receiver Operating Characteristic*), considerando un área bajo la curva (AUC) mayor a 7 y p-valor significativo como biomarcador con capacidad para predecir respuesta patológica. Se consideraron cambios significativos cuando los p-valores fueron: p-valor < 0.05 (\*), p-valor < 0.01 (\*\*), p-valor < 0.001 (\*\*\*) ; también se indican los p-valores cercanos a la significación (> 0.05 y < 0.1).



# Capítulo 4

## Resultados

### 4 RESULTADOS

---

#### 4.1 Características clínicas de los pacientes

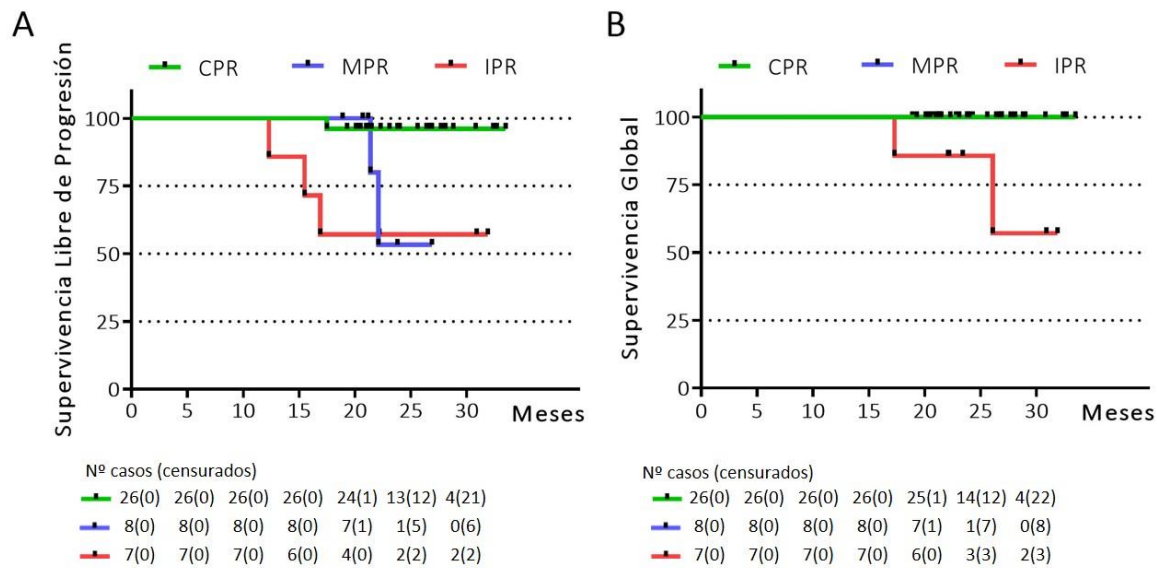
De todas las variables clínicas de los pacientes del ensayo clínico NADIM (anexo II), esta tesis se centra en la relación de la respuesta patológica con la supervivencia de los pacientes y las poblaciones inmunitarias.

##### 4.1.1 Respuestas patológicas

De los 46 pacientes incluidos en el presente trabajo tratados con quimio-inmunoterapia neoadyuvante, 5 pacientes no se operaron, 26 obtuvieron CPR, 8 MPR y 7 IPR.

Se observaron diferencias en la SLP a 24 meses entre los tres grupos de respuesta patológica. Los pacientes con CPR tienen una SLP de 96.2% comparado con un 53.3% en MPR (p-valor 0.041) y 57.1% en IPR (p-valor 0.002). Por otro lado, la SG a 24 meses con CPR y MPR fue de un 100% comparado con un 85.7% en IPR (p-valor 0.002) como se muestra en la figura 12.





**Figura 12. Curvas de SLP (A) y SG (B) con respecto a la respuesta patológica.** Se representan 26 pacientes con respuesta patológica completa (CPR, verde), 8 pacientes con respuesta patológica mayor (MPR, azul) y 7 pacientes con respuesta patológica incompleta (IPR, rojo).

#### 4.1.2 Hemogramas

En los hemogramas de los pacientes no se detectaron diferencias estadísticas entre los tres grupos de respuesta patológica, ni al diagnóstico ni post tratamiento neo-adyuvante en los 41 pacientes que fueron operados (tabla 8A y 8B).

**Tabla 8A. Hemogramas pre tratamiento por grupos de respuesta patológica**

Variable	CPR (Q1-Q3)	MPR (Q1-Q3)	IPR (Q1-Q3)	P-VALOR
Hemoglobina (g/dL)	14,15 (12,93-15,13)	14,55 (14,28-14,75)	13,80 (12,40-15,25)	0,866
Leucocitos (Nº x10 <sup>9</sup> /L)	8,80 (7,59-9,77)	8,24 (6,99-10,92)	10,45 (7,96-11,91)	0,572
Neutrófilos (Nº x10 <sup>9</sup> /L)	4,95 (4,00-6,84)	5,35 (4,04-8,06)	5,81 (4,85-8,06)	0,535
Eosinófilos (Nº x10 <sup>9</sup> /L)	0,21 (0,11-0,31)	0,20 (0,09-0,24)	0,20 (0,20-0,35)	0,525
Basófilos (Nº x10 <sup>9</sup> /L)	0,09 (0,04-0,10)	0,04 (0,00-0,06)	0,04 (0,00-0,08)	0,104
Linfocitos (Nº x10 <sup>9</sup> /L)	2,30 (1,57-3,06)	2,08 (1,90-2,15)	2,00 (1,88-2,30)	0,754
Monocitos (Nº x10 <sup>9</sup> /L)	0,70 (0,55-0,80)	0,61 (0,50-0,74)	0,70 (0,50-1,10)	0,888
Plaquetas (Nº x10 <sup>9</sup> /L)	273,50 (224,25-336,25)	268,50 (210,25-364,25)	296,00 (246,00-365,50)	0,803
LDH (UI/L)	208,00 (182,25-335,00)	255,00 (172,00-342,50)	245,00 (191,70-300,00)	0,987
Ratio NLR	2,45 (1,39-3,89)	2,53 (2,02-3,38)	2,70 (2,16-3,78)	0,626
Ratio M:L	2,85 (1,81-4,64)	2,89 (2,48-3,72)	3,30 (2,46-4,49)	0,604
Ratio PLR	118,37 (87,42-172,28)	135,16 (114,64-171,01)	146,82 (106,92-194,50)	0,667
Ratio dNLR	1,75 (1,07-2,24)	1,86 (1,35-2,46)	1,68 (1,54-2,25)	0,659

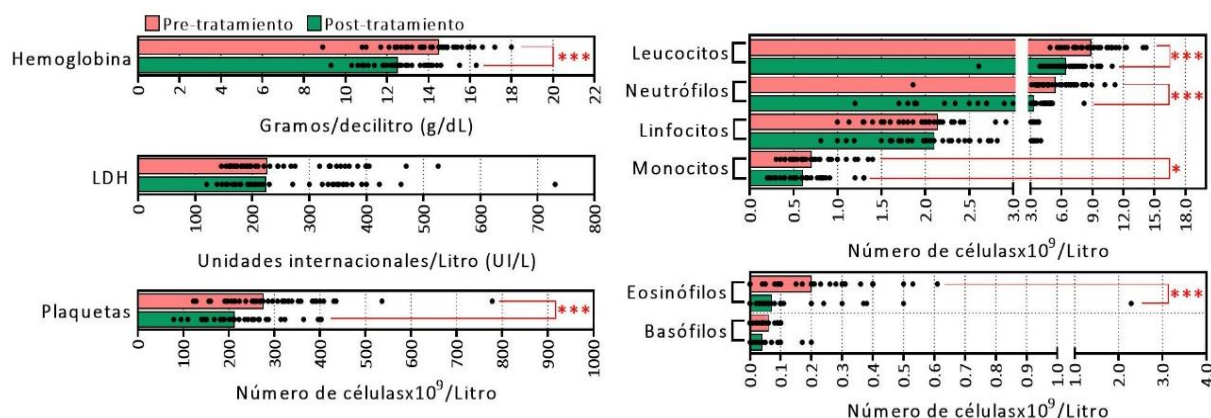
Prueba de Kruskal-Wallis. Se indican medianas con cuartiles Q1 y Q3 y p-valores.

**Tabla 8B. Hemograma post tratamiento por grupos de respuesta patológica**

Variable	CPR (Q1-Q3)	MPR (Q1-Q3)	IPR (Q1-Q3)	P-VALOR
Hemoglobina (g/dL)	12,45 (11,83-13,75)	12,75 (12,00-13,28)	12,00 (10,70-13,55)	0,725
Leucocitos (Nº x10 <sup>9</sup> /L)	6,59 (5,18-8,07)	5,83 (4,76-6,29)	7,08 (6,50-7,95)	0,326
Neutrófilos (Nº x10 <sup>9</sup> /L)	3,39 (2,63-4,38)	3,07 (1,86-3,72)	3,40 (3,12-4,55)	0,476
Eosinófilos (Nº x10 <sup>9</sup> /L)	0,07 (0,03-0,11)	0,04 (0,02-0,08)	0,10 (0,07-0,10)	0,463
Basófilos (Nº x10 <sup>9</sup> /L)	0,04 (0,01-0,10)	0,04 (0,01-0,05)	0,04 (0,01-0,10)	0,932
Linfocitos (Nº x10 <sup>9</sup> /L)	2,04 (1,64-2,74)	2,05 (1,91-2,44)	2,45 (2,05-2,78)	0,653
Monocitos (Nº x10 <sup>9</sup> /L)	0,60 (0,49-0,79)	0,58 (0,37-0,74)	0,59 (0,35-1,00)	0,921
Plaquetas (Nº x10 <sup>9</sup> /L)	228,50 (156,00-278,50)	244,50 (177,50-292,25)	190,00 (181,50-233,50)	0,598
LDH (UI/L)	214,50 (192,00-349,00)	323,00 (240,50-350,50)	212,00 (178,50-326,50)	0,814
Ratio NLR	1,38 (1,21-2,10)	1,40 (1,00-1,54)	1,41 (1,35-1,82)	0,76
Ratio M:L	1,85 (1,51-2,69)	1,68 (1,37-1,88)	1,81 (1,64-2,06)	0,747
Ratio PLR	104,80 (85,72-127,97)	99,62 (69,10-160,85)	78,70 (67,21-112,29)	0,558
Ratio dNLR	1,06 (0,86-1,45)	1,05 (0,71-1,13)	1,03 (0,99-1,34)	0,716

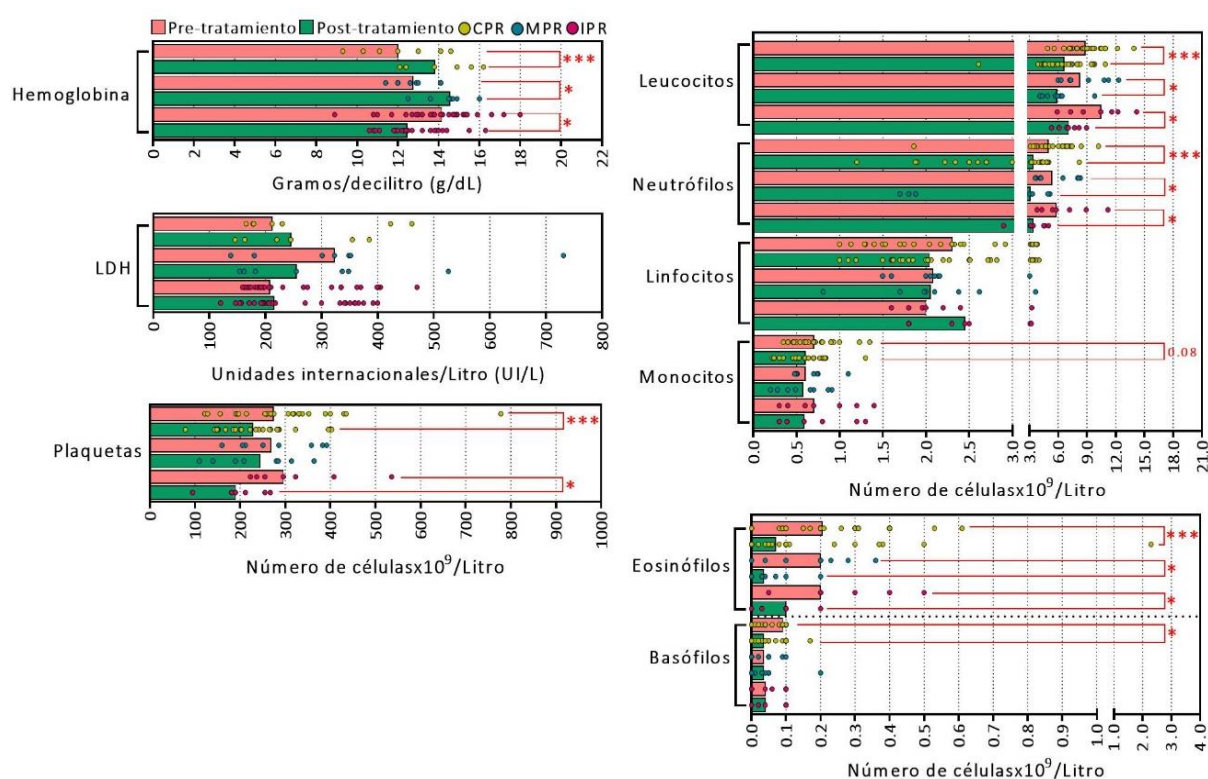
Prueba de Kruskal-Wallis. Se indican medianas con cuartiles Q1 y Q3 y p-valores

En el estudio del efecto del tratamiento neo-adyuvante en las poblaciones celulares de los hemogramas se observó una disminución significativa post tratamiento neo-adyuvante de los niveles de hemoglobina, plaquetas, leucocitos, neutrófilos, monocitos y eosinófilos, sin considerar la respuesta patológica (N=46) (figura 13).



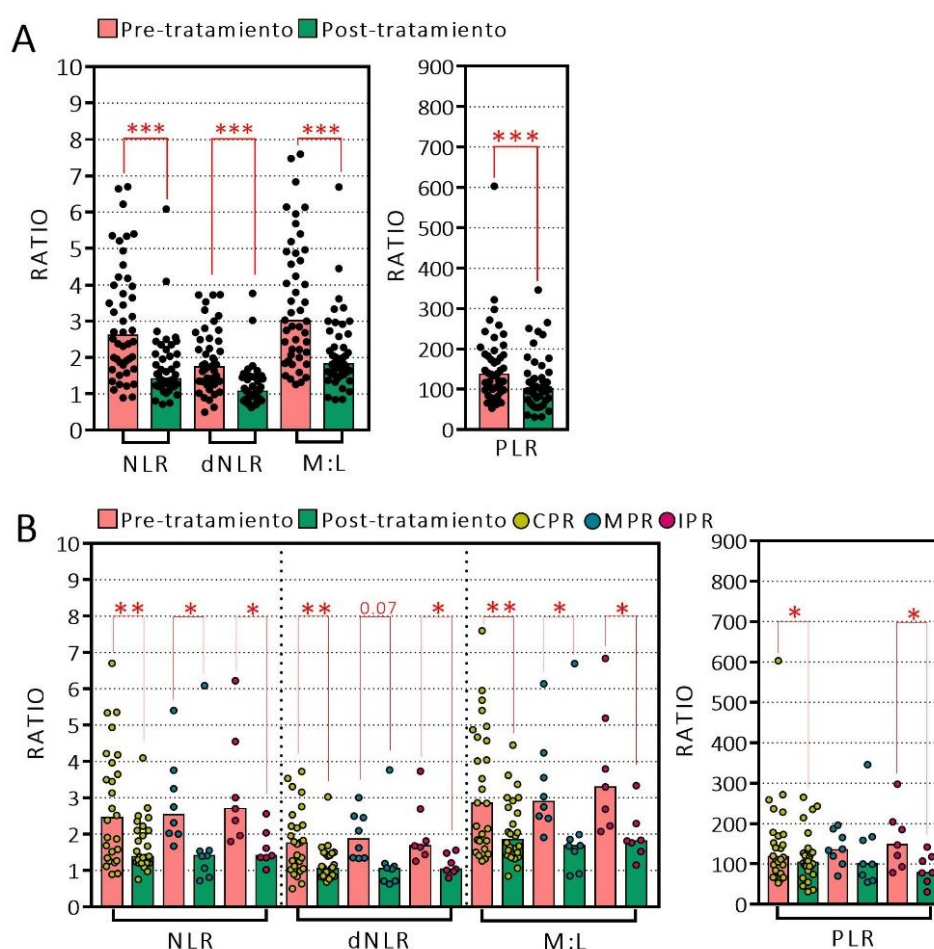
**Figura 13. Efecto del tratamiento global en las poblaciones celulares del hemograma.** Se representan niveles de células de 46 pacientes al diagnóstico (pre-tratamiento, barra coral) y después del tratamiento (post-tratamiento, barra verde) con independencia de la respuesta patológica. Se utilizó el test de datos pareados no paramétricos Wilcoxon (\*p-valor<0.05; \*\*p-valor<0.01; \*\*\*p-valor<0.001).

Al valorar el efecto del tratamiento en los diferentes grupos de respuesta patológica observamos que esta disminución se mantuvo significativa en los 3 grupos de respuesta patológica únicamente para leucocitos, neutrófilos y eosinófilos. Sin embargo, los pacientes con CPR y MPR incrementaron de forma estadísticamente significativa los niveles de hemoglobina post tratamiento. Por otro lado, se perdió la significación estadística para la disminución de los niveles de monocitos producida por el tratamiento neo-adyuvante en los tres grupos de respuesta y en las plaquetas solo se mantuvo en los pacientes con CPR e IPR. En cuanto a los basófilos, aunque globalmente no se encontraron diferencias significativas, los pacientes con CPR disminuyeron sus valores post tratamiento (figura 14).



**Figura 14. Efecto del tratamiento por respuesta patológica en las poblaciones celulares del hemograma.** Se representan la variación por tratamiento de 41 pacientes por respuesta patológica (26 CPR, 8 MPR y 7 IPR). Se utilizó el test de datos pareados no paramétricos Wilcoxon (\*p-valor<0.05; \*\*p-valor<0.01; \*\*\*p-valor<0.001).

En cuanto a los ratios celulares, post tratamiento se observa una disminución significativa de NLR, dNLR, M:L y PLR independientemente de la respuesta patológica (figura 15-A). A su vez, como ocurría anteriormente, estas diferencias ocurren en los 3 grupos de respuesta patológica excepto dNLR y PLR en los pacientes con MPR, en el que este descenso no llega a alcanzar la significación estadística (figura 15-B).



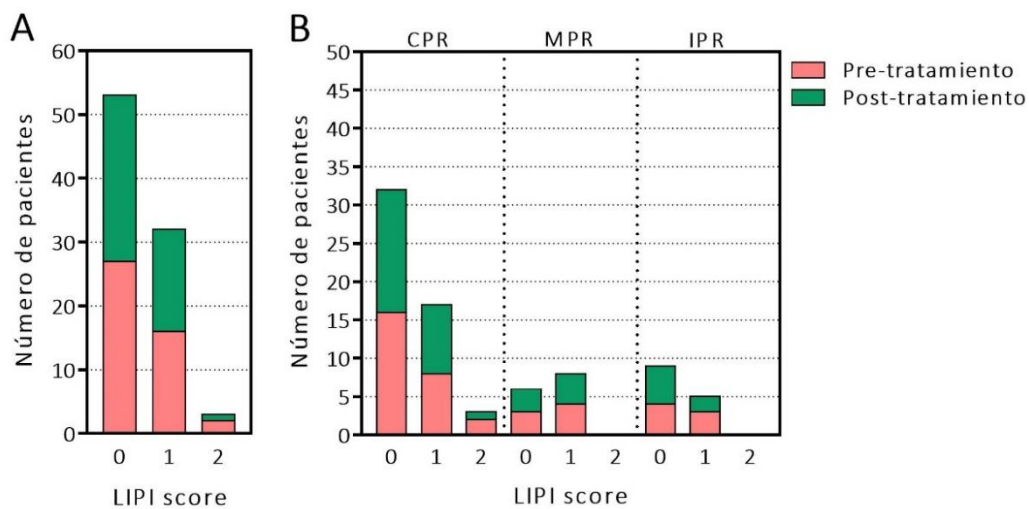
**Figura 15. Efecto del tratamiento en los ratios celulares del hemograma. A.** Se representan 46 pacientes al diagnóstico (pre-tratamiento, barra coral) y después del tratamiento (post-tratamiento, barra verde) independientemente de la respuesta patológica. **B.** Se representa la variación por tratamiento en 41 pacientes por respuesta patológica (26 CPR, 8 MPR y 7 IPR). Se utilizó el test de datos pareados no paramétricos Wilcoxon (\*p-valor<0.05; \*\*p-valor<0.01; \*\*\*p-valor<0.001).

Al desarrollar el LIPI score tampoco se apreciaron diferencias significativas entre los grupos de respuesta patológica ni al momento del diagnóstico ni post tratamiento neo-adyuvante (tabla 9 y figura 16).

**Tabla 9. Respuesta patológica versus LIPI score**

Respuesta patológica	LIPI score pre tratamiento			$\chi^2$	LIPI score post tratamiento			$\chi^2$
	0	1	2		0	1	2	
<b>CPR (N=26)</b>	16 (61,5)	8 (30,8)	2 (7,7)	0,645	16 (61,5)	9 (34,6)	1 (3,8)	0,741
<b>MPR (N=7)</b>	3 (42,9)	4 (57,1)	0 (0)		3 (42,9)	4 (57,1)	0 (0)	
<b>IPR (N=7)</b>	4 (57,1)	3 (42,9)	0 (0)		5 (71,4)	2 (28,6)	0 (0)	

Pueba Chi cuadrado ( $\chi^2$ ) de Pearson. Se indica número de pacientes y (porcentaje).



**Figura 16. Efecto del tratamiento en el LIPI score.** A. Se representan 45 pacientes al diagnóstico (pre-tratamiento, barra coral) y 43 pacientes después del tratamiento (post-tratamiento, barra verde) independiente de la respuesta patológica. B. Se representa la variación por tratamiento en 40 pacientes por respuesta patológica (26 CPR, 7 MPR y 7 IPR).

## 4.2 Características moleculares de los pacientes

En este apartado nos centraremos en los resultados obtenidos en las muestras de tejido para profundizar en el microambiente tumoral y en muestras de sangre periférica para el análisis de poblaciones inmunitarias y factores solubles en plasma.

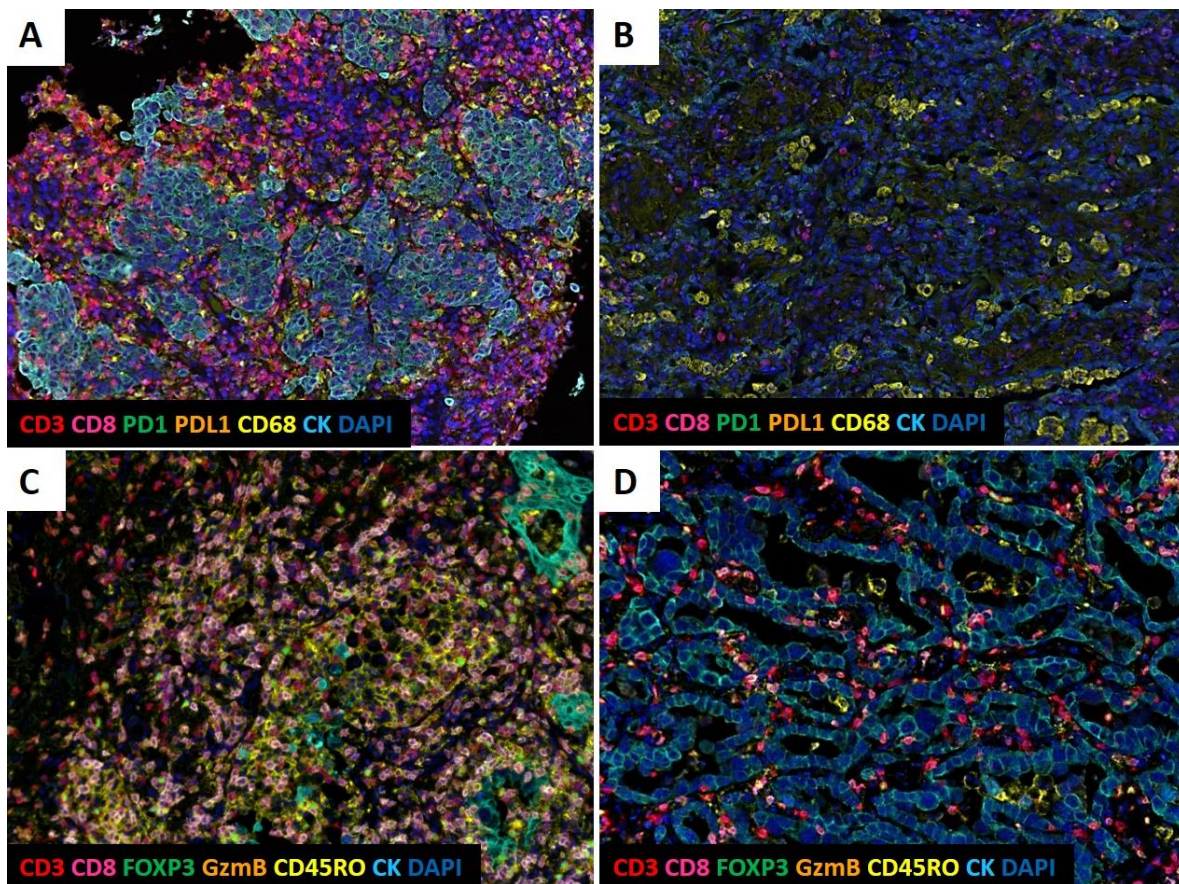
### 4.2.1 Microambiente tumoral

El estudio del microambiente tumoral se basa en la localización, cuantificación y fenotipo de los linfocitos infiltrados, tanto en la zona del tumor como en el estroma, mediante la técnica multiplex de inmunofluorescencia en biopsias tumorales.

Debido a la disponibilidad de muestras de tejido se utilizaron 12 pacientes (6 CPR, 4 MPR y 2 IPR) al diagnóstico (pre tratamiento) que nos podrán indicar el valor pronóstico de las poblaciones inmunitarias y 17 pacientes (6 CPR, 5 MPR y 6 IPR) de la cirugía (post tratamiento) que nos indicarán la asociación de estas poblaciones inmunitarias con la respuesta patológica.

El análisis de las imágenes realizado por el patólogo especializado del grupo colaborador proporcionó el número de células por mm<sup>2</sup> de tejido. A continuación se muestra un ejemplo de las imágenes analizadas: se representa una muestra pre tratamiento y post tratamiento de un paciente con CPR (panel 1) y dos muestras post tratamiento de un paciente con MPR y otro con IPR (panel 2) en la figura 17.

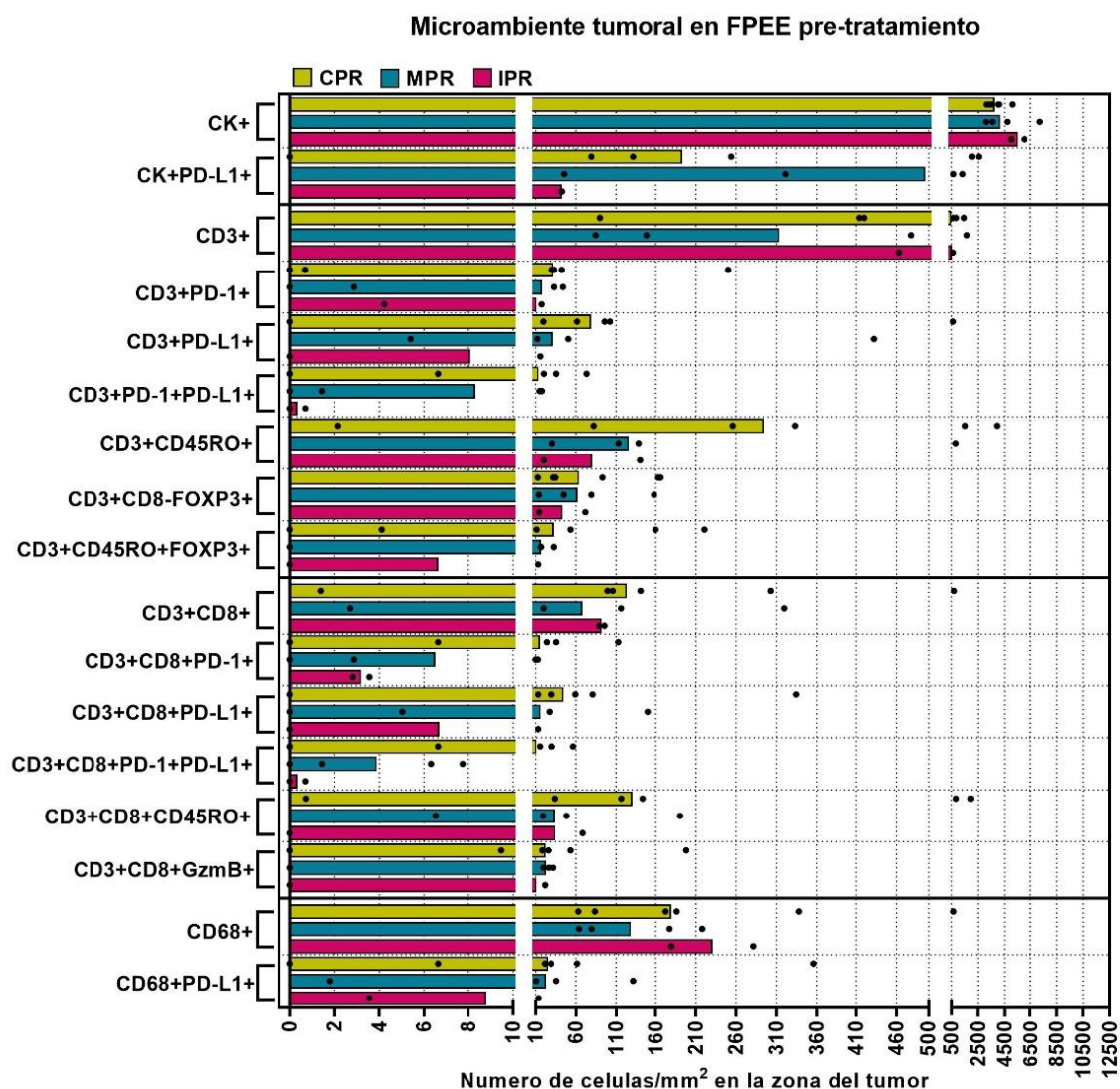




**Figura 17. Ejemplo de análisis de la técnica de inmunofluorescencia multiplex.** Se representan la muestra pre tratamiento (A) y post tratamiento (B) de un paciente con respuesta completa obtenidas del panel 1. Así como dos muestras post tratamiento de un paciente con respuesta mayor (C) y otro con respuesta incompleta (D) usando el panel 2.

#### 4.2.1.1 Biomarcadores al diagnóstico

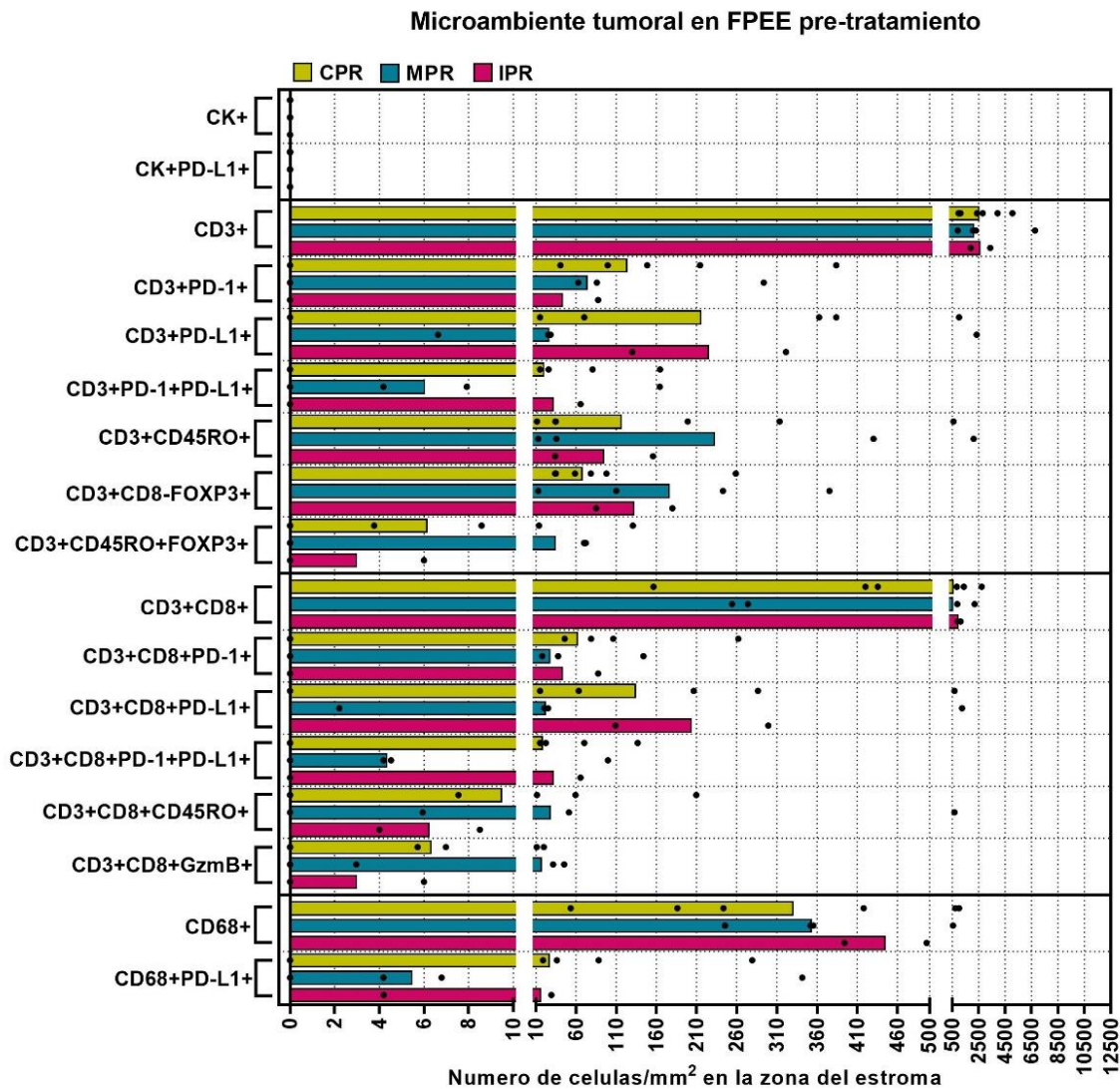
Debido al número de muestras de tejido al diagnóstico, donde sólo pudimos analizar 2 pacientes con IPR, no se pudieron estimar diferencias significativas en las poblaciones celulares relacionadas con la respuesta patológica de los pacientes, ni la zona del tumor ni en el estroma. Por lo que a continuación se procede a describir posibles tendencias o diferencias entre los tres grupos de respuesta patológica. Se observó una tendencia a un mayor número de células T memoria ( $CD3^+CD45RO^+$  y  $CD3^+CD8^+CD45RO^+$ ), así como células T y células T CD8 positivas para PD-1 y PD-L1 en pacientes con CPR (figura 18).



**Figura 18. Infiltración celular en el tumor por respuesta patológica en biopsias al diagnóstico.** Se representan los datos obtenidos de 6 pacientes con respuesta completa (CPR, amarillo), 4 con respuesta mayor (MPR, azul) y 2 con respuesta incompleta (IPR, granate). Al tener solo 2 pacientes en el grupo de IPR no se pudieron estimar diferencias significativas.

Al centrarnos en la zona del estroma en las mismas muestras se podría apreciar una tendencia a tener mayor infiltración de células T y células T CD8 positivas para PD-1 y PD-L1 en pacientes con CPR, así como una mayor infiltración de macrófagos en la zona del estroma en pacientes con IPR (figura 19).





**Figura 19. Infiltración celular en el estroma por respuesta patológica en biopsias al diagnóstico.** Se representan los datos obtenidos de 6 pacientes con respuesta completa (CPR, amarillo), 4 con respuesta mayor (MPR, azul) y 2 con respuesta incompleta (IPR, granate). Al tener solo 2 pacientes en el grupo de IPR no se pudieron estimar diferencias significativas.

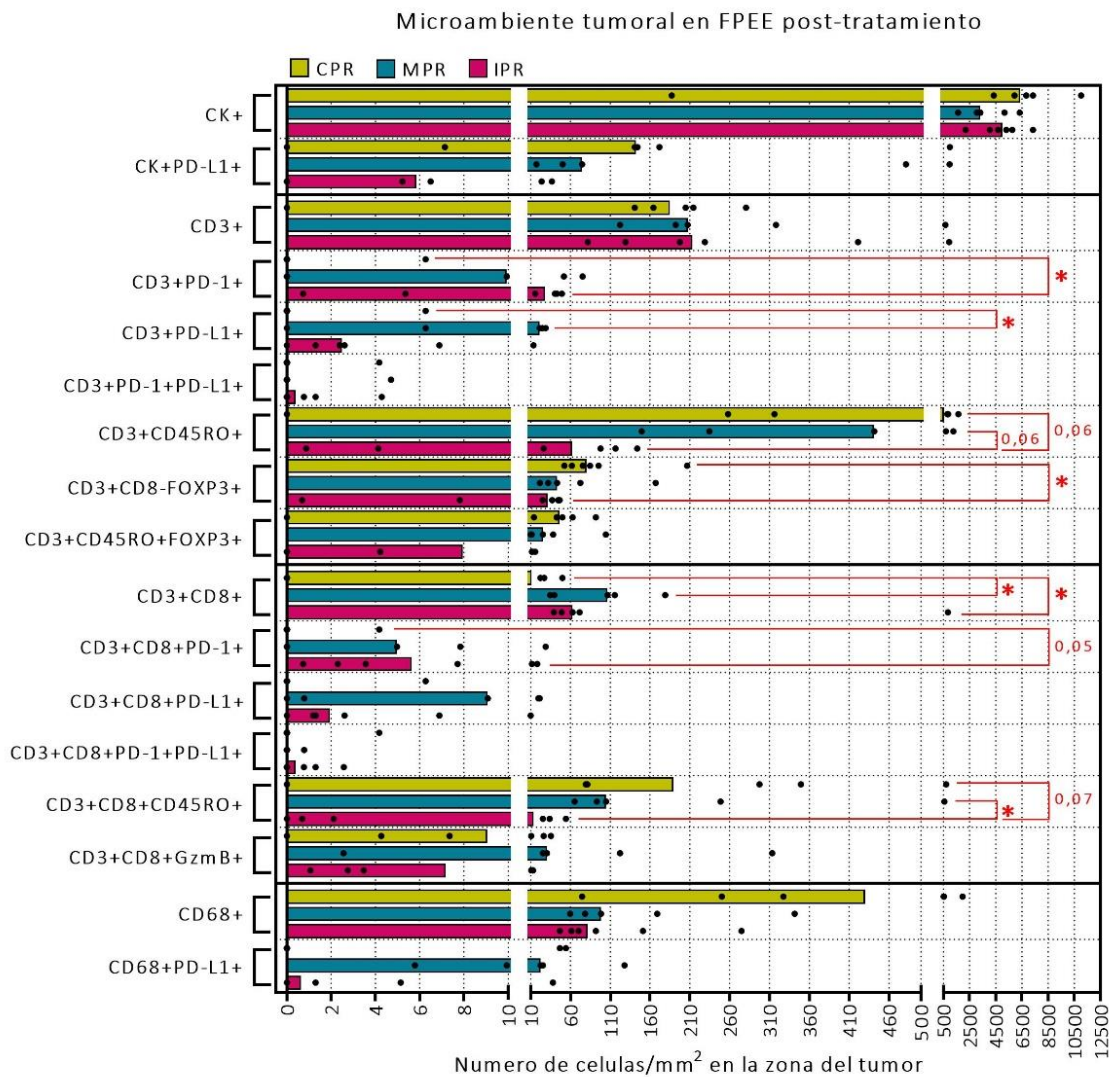
#### 4.2.1.2 Biomarcadores post tratamiento neo-adyuvante

En el estudio del microambiente tumoral del tejido después del tratamiento neo-adyuvante se identificaron varias poblaciones inmunitarias características de los diferentes tipos de respuesta patológica.

En primer lugar, centrándonos en la zona del tumor, se encontraron más diferencias significativas entre pacientes con CPR y IPR. Los pacientes con CPR presentaron, de manera significativa, un mayor número de células T reguladoras ( $CD3^+CD8^-FOXP3^+$ ). Estos niveles más elevados también se detectaron en células T memoria ( $CD3^+CD45RO^+$ ) y células citotóxicas T memoria ( $CD3^+CD8^+CD45RO^+$ ), sin llegar a ser estas diferencias estadísticamente significativas con p-valores de 0.06 y 0.07 respectivamente. Además, aunque en el análisis por grupos los macrófagos ( $CD68^+$ ) no mostraron diferencias estadísticas, se observó una tendencia a niveles más elevados de los mismos en pacientes con CPR (figura 20). En cambio, los pacientes con CPR tenían niveles más bajos de  $CD3^+CD8^+$ , así como linfocitos CD3 o CD8 que expresan PD-1 (figura 20).

En segundo lugar se encontraron diferencias entre pacientes con CPR y MPR. En este caso, los pacientes con CPR tenían menor número de células  $CD3^+PD-L1^+$  y  $CD3^+CD8^+$  (figura 20).

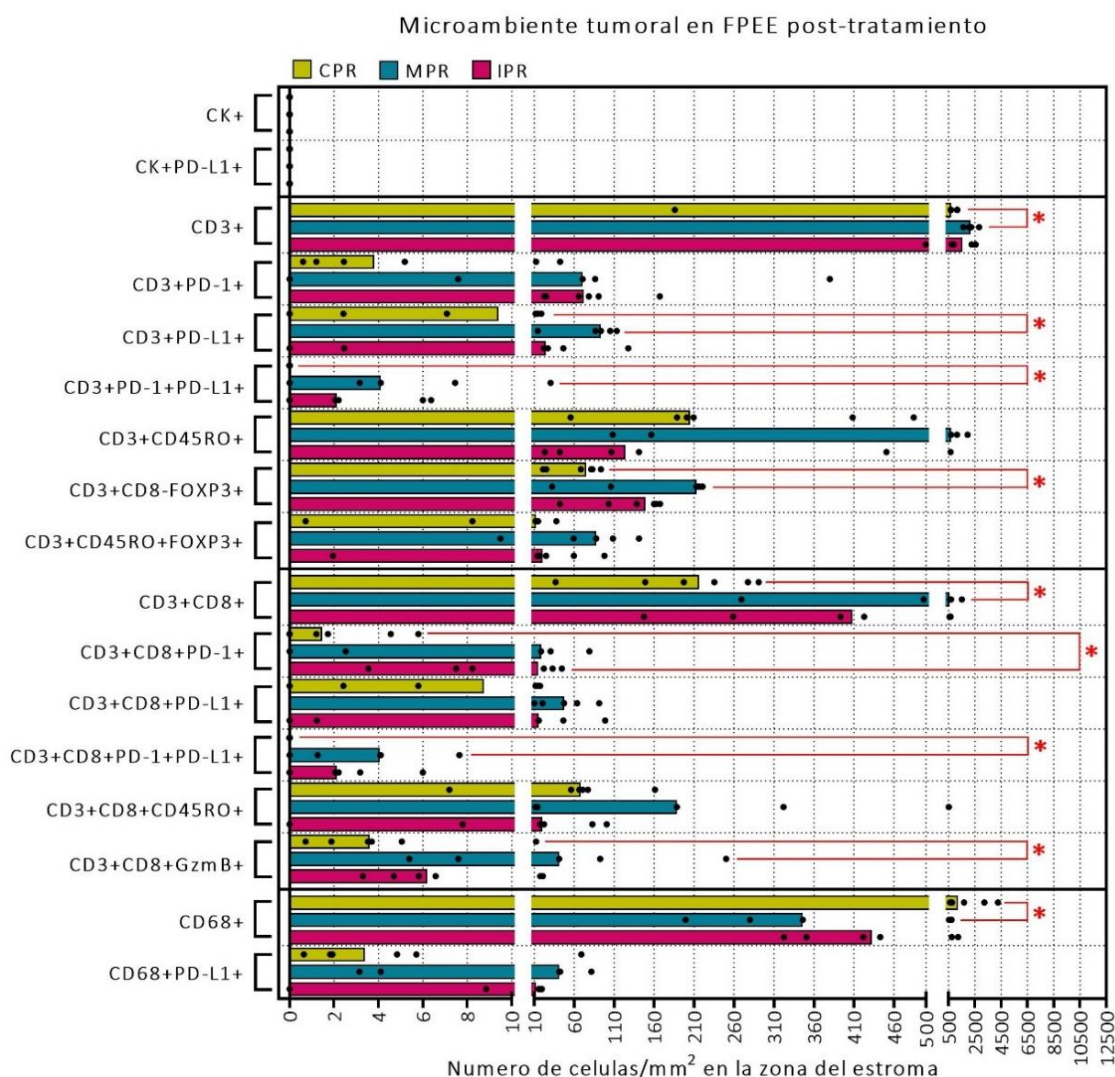
Por último, en cuanto a las diferencias entre pacientes con MPR e IPR, se distinguió un mayor número de células T memoria citotóxicas ( $CD3^+CD8^+CD45RO^+$ ) en pacientes con MPR y una posible tendencia a tener mayor número de células T memoria ( $CD3^+CD45RO^+$ ) con un p-valor de 0.06 (figura 20).



**Figura 20. Infiltración celular en el tumor por respuesta patológica en biopsias de la cirugía.** Se representan los datos obtenidos de 6 pacientes con respuesta completa (CPR, amarillo), 5 con respuesta mayor (MPR, azul) y 6 con respuesta incompleta (IPR, granate). Se utilizó el test de datos no paramétricos Kruskal Wallis, indicando p-valor por pares de aquellos análisis significativos (\*p-valor<0.05; \*\*p-valor<0.01; \*\*\*p-valor<0.001).

En cuanto a la zona del estroma, las mayores diferencias se detectaron entre pacientes con CPR y MPR. Los pacientes con CPR tenían un menor número de células T (CD3<sup>+</sup>), células T que expresan PD-L1 (CD3<sup>+</sup>PD-L1<sup>+</sup>), células T reguladoras (CD3<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup>FOXP3<sup>+</sup>), células T citotóxicas (CD3<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup>), células T citotóxicas con expresión de PD-1 y PD-L1 (CD3<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup>PD-1<sup>+</sup>PD-L1<sup>+</sup>) y células T citotóxicas activadas (CD3<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup>GZMB<sup>+</sup>). En cambio, los pacientes con CPR tenían un mayor número de macrófagos (CD68<sup>+</sup>) (figura 21).

Sin embargo, al comparar los pacientes con CPR e IPR, solo aparecieron diferencias significativas en las células T citotóxicas con expresión de PD-1 ( $CD3^+CD8^+PD-1^+$ ), siendo más bajas en pacientes con CPR. Además de estas diferencias significativas, se pudo apreciar un menor número de células T ( $CD3^+$ ) y macrófagos ( $CD68^+$ ) en los pacientes con CPR en comparación con MPR e IPR. Por último, en la zona del estroma no se encontraron diferencias entre los pacientes con MPR e IPR (figura 21).

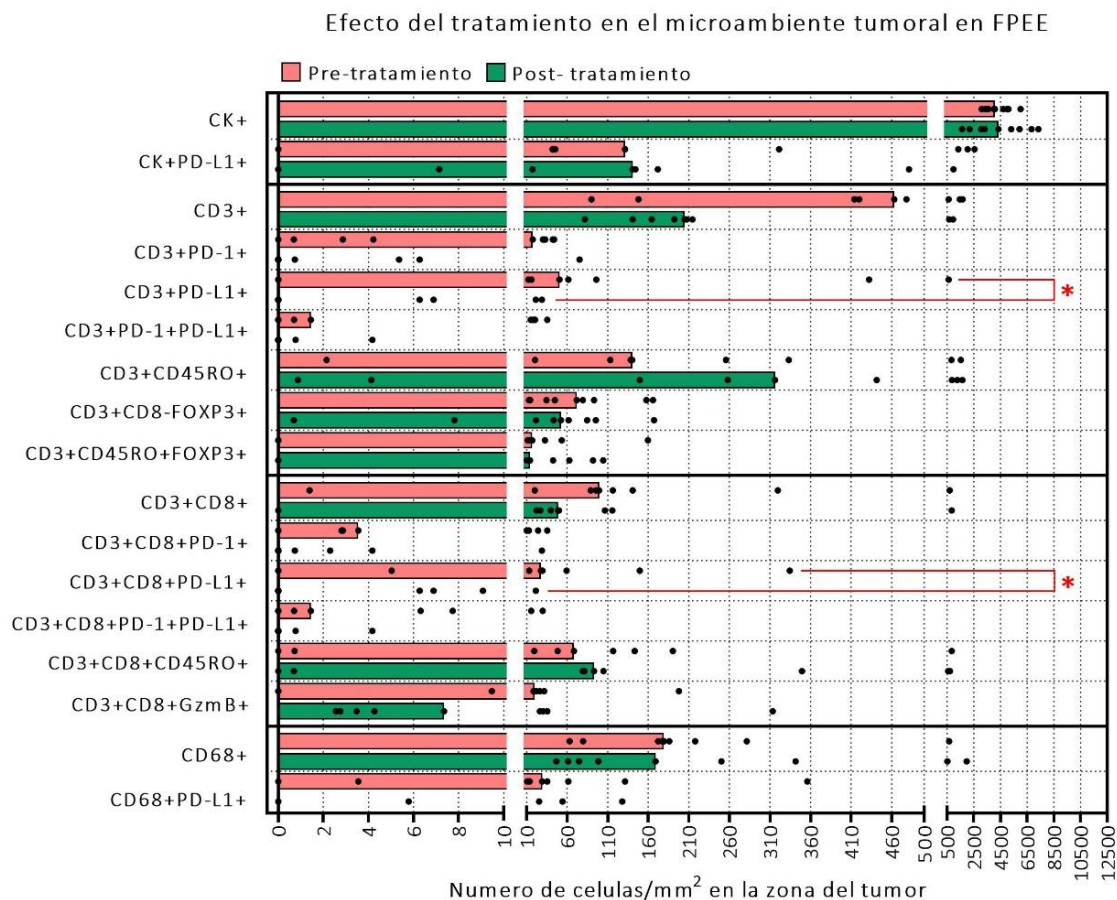


**Figura 21. Infiltración celular en el estroma por respuesta patológica en biopsias de la cirugía.** Se representan los datos obtenidos de 6 pacientes con respuesta completa (CPR, amarillo), 5 con respuesta mayor (MPR, azul) y 6 con respuesta incompleta (IPR, granate). Se utilizó el test de datos no paramétricos Kruskal Wallis, indicando p-valor por pares de aquellos análisis significativos (\*p-valor<0.05; \*\*p-valor<0.01; \*\*\*p-valor<0.001).



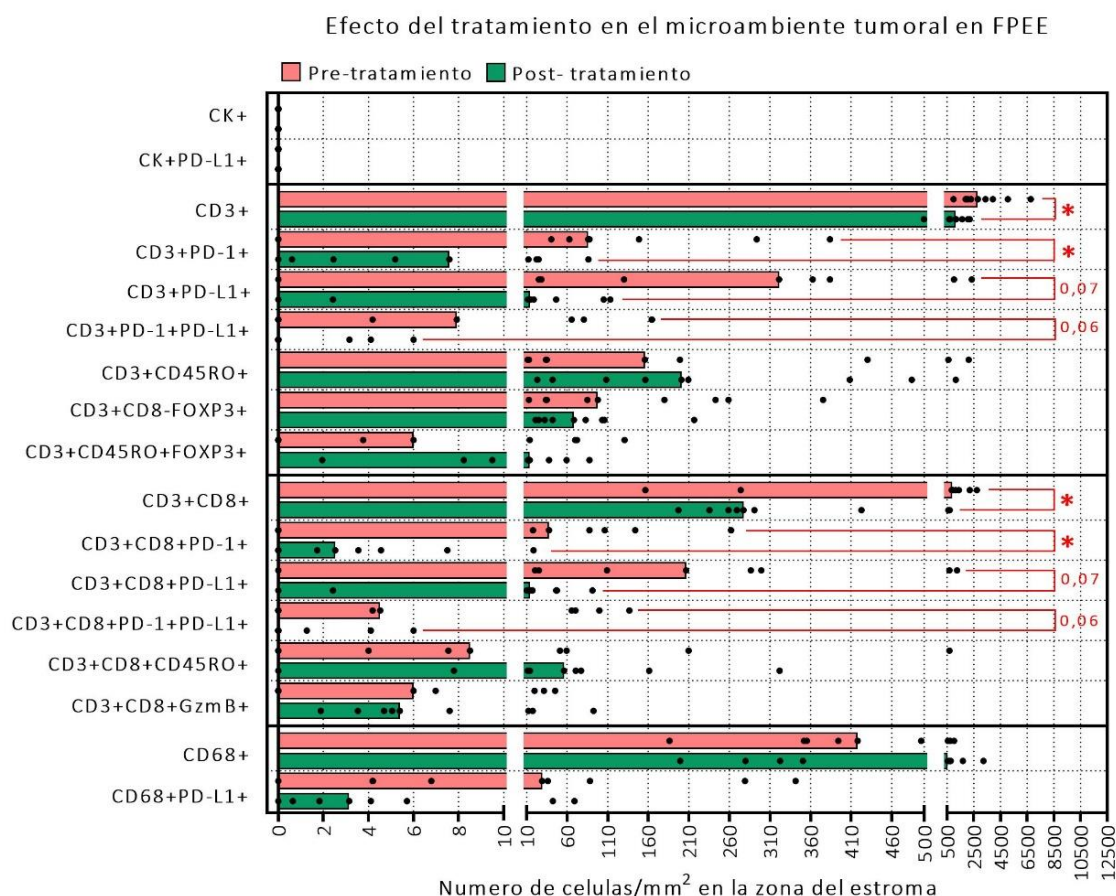
#### 4.2.1.3 Variación en biomarcadores tras el tratamiento neo-adyuvante

Cuando se comparó el efecto del tratamiento sobre las poblaciones celulares en la zona del tumor, se distinguió una disminución de las poblaciones T y CD8 citotóxicas con presencia del ligando PD-L1. Adicionalmente, las células T y células T CD8 positivas para PD-1 fueron prácticamente indetectables post tratamiento. Aunque no de manera significativa, se observó una menor infiltración células T (CD3<sup>+</sup>, p-valor 0.110) y macrófagos PD-L1<sup>+</sup> (p-valor 0.263) post tratamiento (figura 22).



**Figura 22. Efecto del tratamiento en el tumor de biopsias al diagnóstico y cirugía.** Se representan los datos obtenidos de 9 pacientes pareados al diagnóstico (pre tratamiento) y a la cirugía (post tratamiento). Se utilizó el test de datos no paramétricos Wilcoxon (\*p-valor<0.05; \*\*p-valor<0.01; \*\*\*p-valor<0.001).

En la zona del estroma se observó una disminución significativa de células T (CD3<sup>+</sup>) y T CD8 citotóxicas (CD3<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup>) con o sin presencia de PD-1<sup>+</sup>, así como una tendencia hacia niveles más bajos de estas poblaciones CD3<sup>+</sup> y CD3<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup> con expresión de PD-L1<sup>+</sup> post tratamiento neo-adyuvante (figura 23).



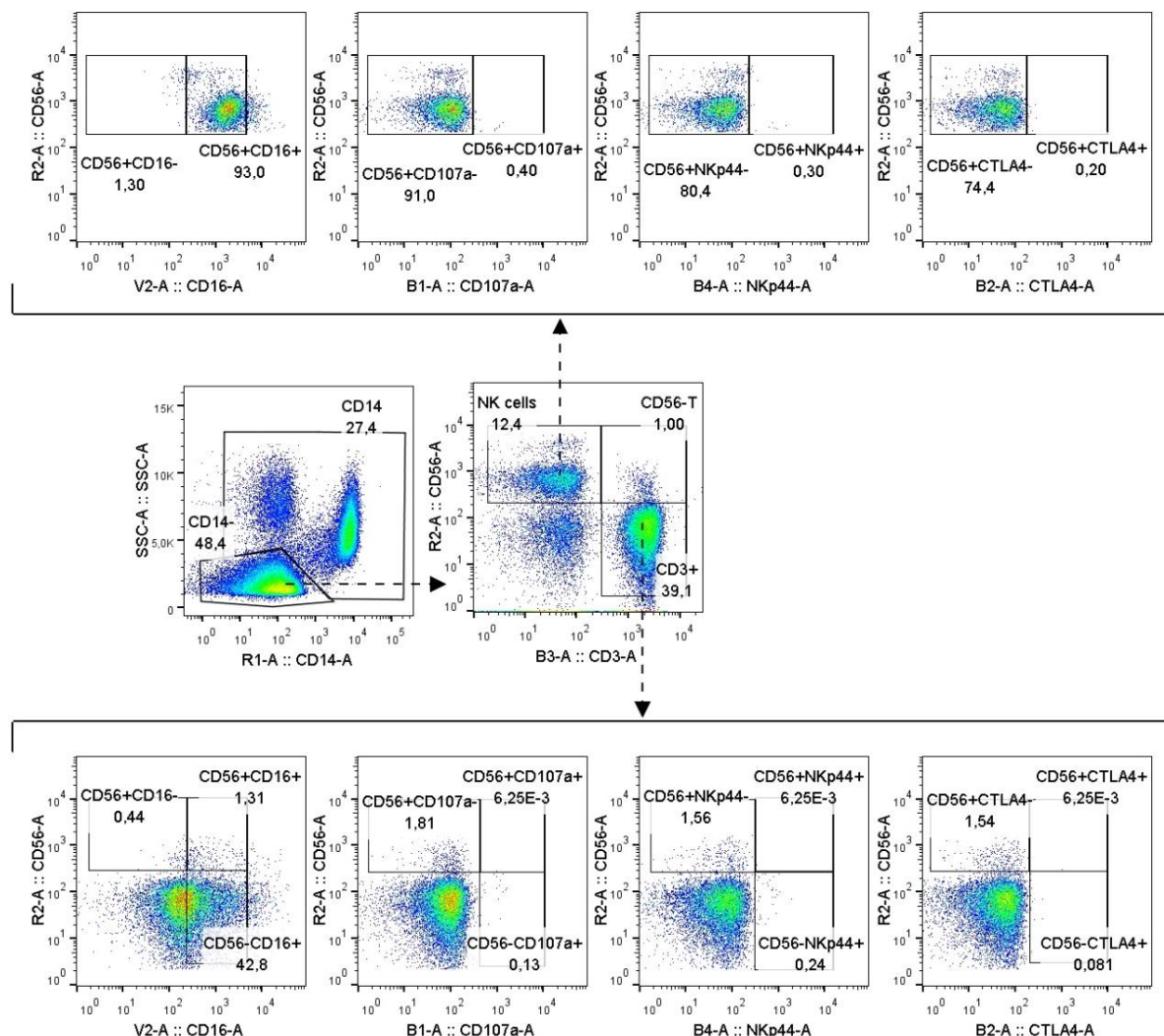
**Figura 23. Efecto del tratamiento en el estroma de biopsias al diagnóstico y cirugía.** Se representan los datos obtenidos de 9 pacientes pareados al diagnóstico (pre tratamiento) y a la cirugía (post tratamiento). Se utilizó el test de datos no paramétricos Wilcoxon (\*p-valor<0.05; \*\*p-valor<0.01; \*\*\*p-valor<0.001).

#### 4.2.2 Células inmunitarias en sangre periférica

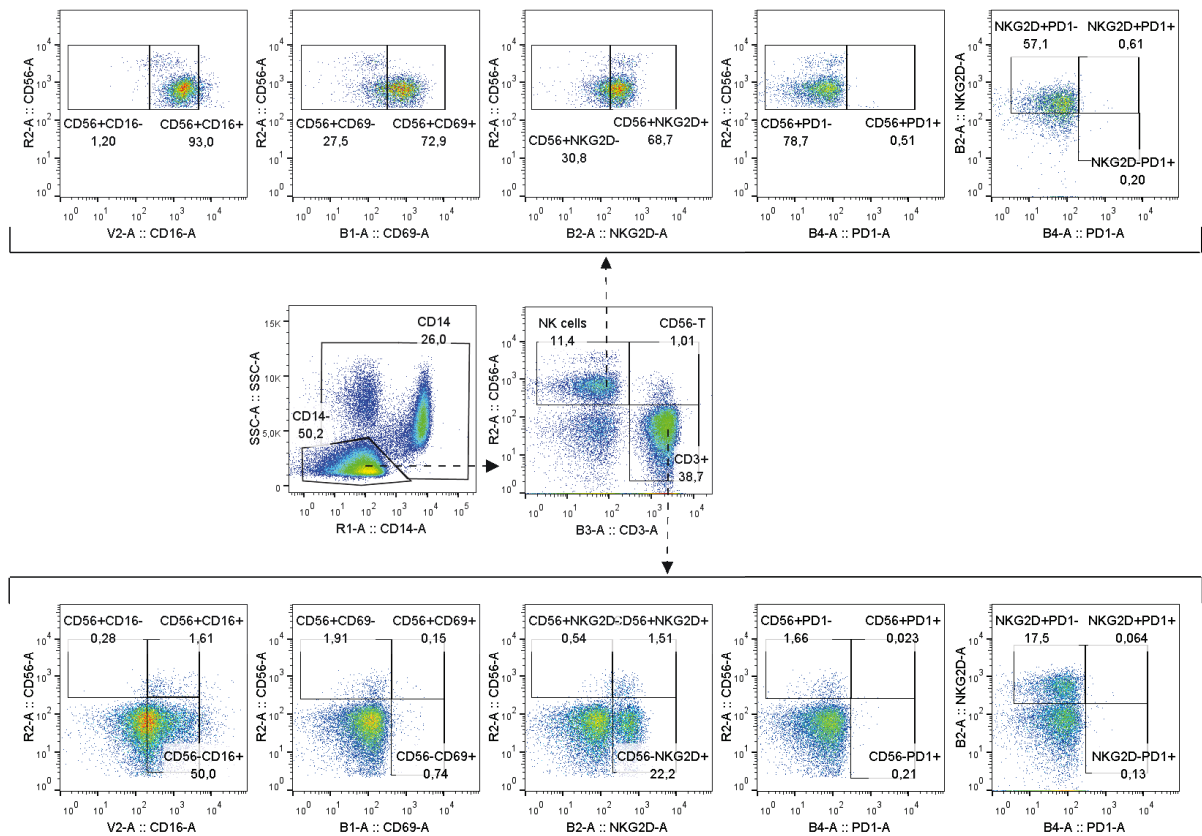
Este apartado se centra en las células inmunitarias en sangre periférica, en el momento del diagnóstico y post tratamiento neo-adyuvante, así como el efecto que el tratamiento podría producir en las mismas. Debido a que los resultados obtenidos en tejido sugirieron

diferencias en el microambiente tumoral de pacientes con respuestas patológicas completas, los análisis en sangre periférica se centraron en la identificación de biomarcadores al diagnóstico de CPR. Para ello se agruparon los pacientes con MPR e IPR formando la clasificación CPR *versus* no CPR.

Puesto que se examinaron un número elevado de marcadores, todas las poblaciones estudiadas con sus medianas, intercuartiles y p-valores, se representan en forma de tablas en el anexo I. A continuación se detalla un ejemplo del análisis de citometría de flujo y se representara mediante gráficos de barras únicamente aquellas diferencias significativas entre pacientes CPR y no CPR.

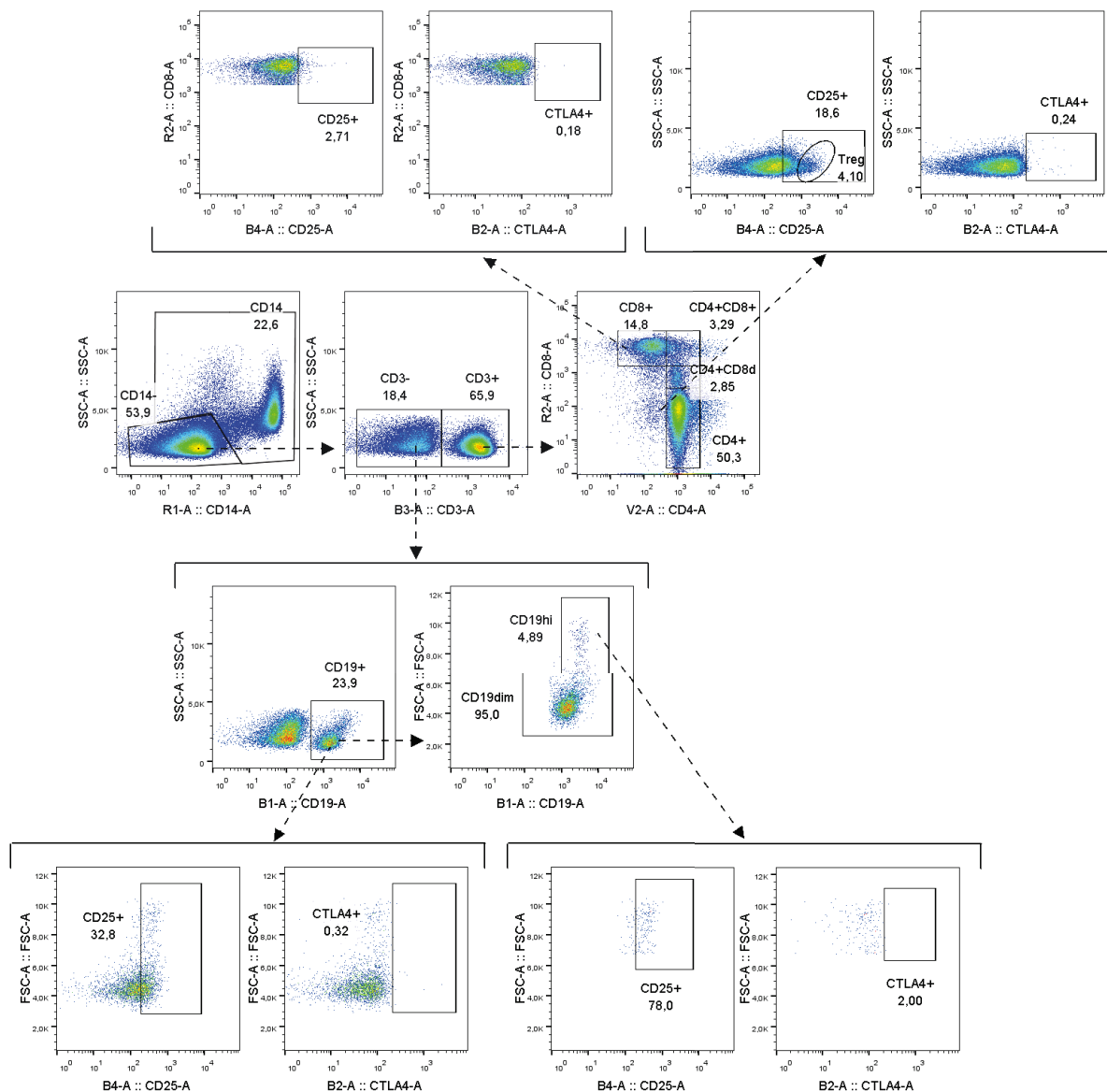


**Figura 24. Análisis de células NK y células T del panel 1.** A partir de la población CD14<sup>-</sup> se seleccionaron los linfocitos T (CD3<sup>+</sup>) y las células NK (CD3<sup>-</sup>CD56<sup>+</sup>). Después se determinó la activación de ambos tipos celulares mediante CD16, CD107a, CTLA-4 y NKp44.

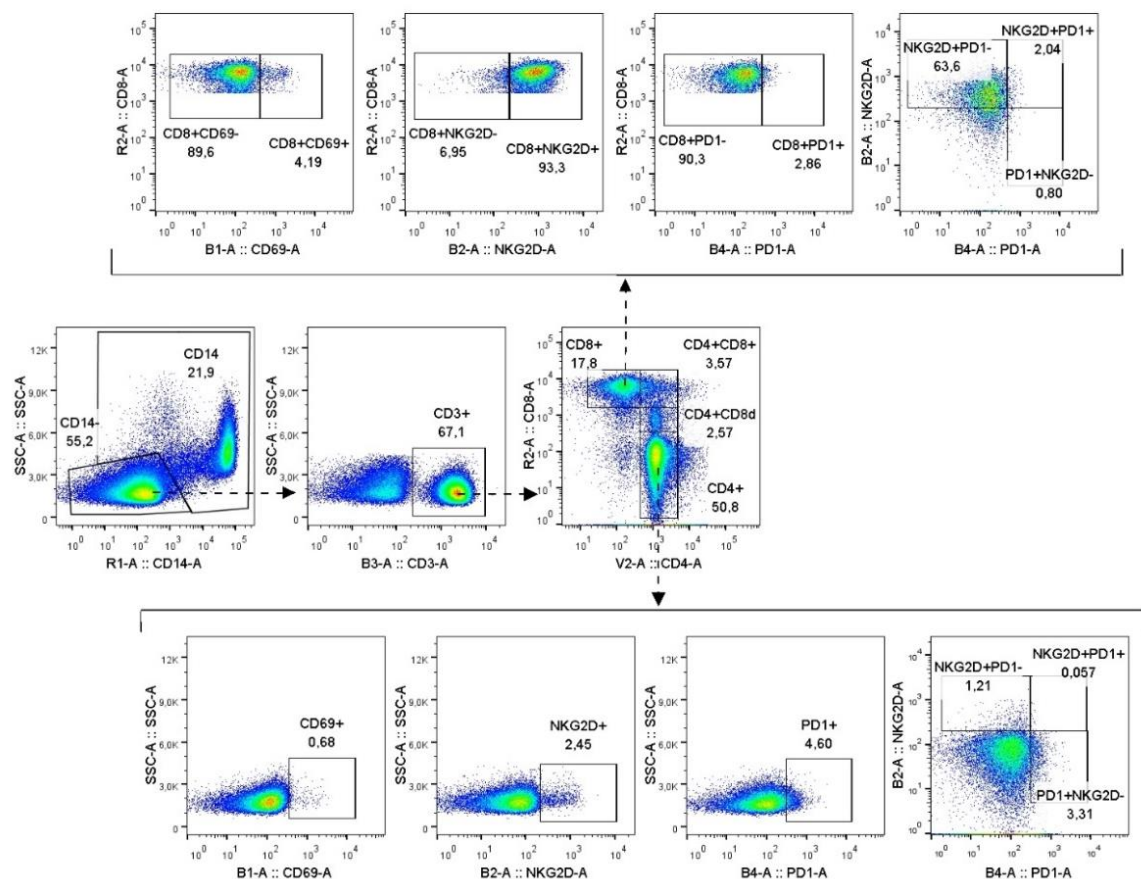


**Figura 25. Análisis de células NK y células T del panel 2.** A partir de la población CD14<sup>+</sup> se seleccionaron los linfocitos T (CD3<sup>+</sup>) y las células NK (CD3<sup>+</sup>CD56<sup>+</sup>), después se analizó la activación de ambos tipos celulares mediante CD16, CD69, NKG2D y PD-1.

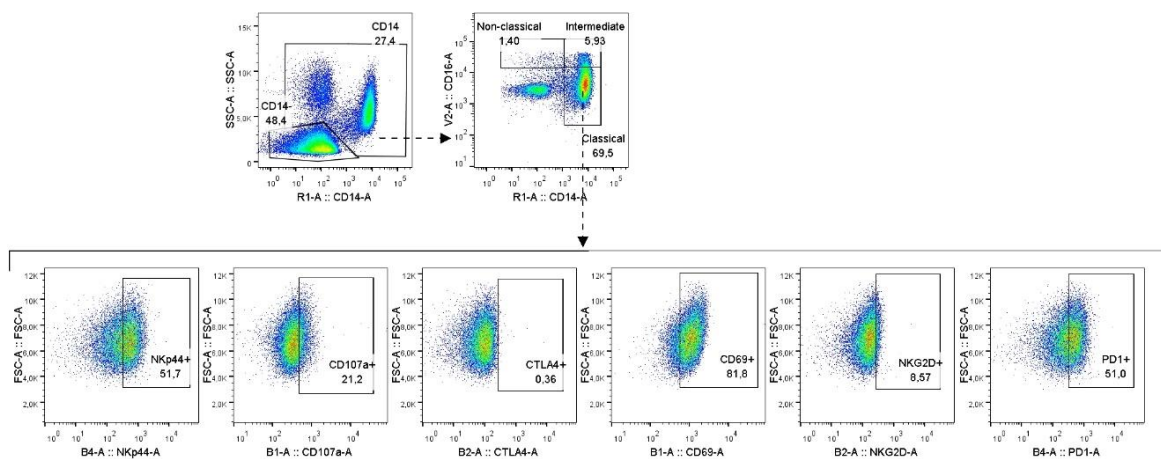




**Figura 26. Análisis de células B y células T del panel 3.** A partir de la población CD14<sup>-</sup> se seleccionaron los linfocitos T (CD3<sup>+</sup>) en CD4<sup>+</sup> y CD8<sup>+</sup>, así como los linfocitos B (CD3<sup>-</sup>CD19<sup>+</sup>), después se determinó la activación de cada tipo celular mediante CTLA-4 y CD25.



**Figura 27. Análisis de células B y células T del panel 4.** A partir de la población CD14<sup>-</sup> se seleccionaron los linfocitos T (CD3<sup>+</sup>) en CD4<sup>+</sup> y CD8<sup>+</sup>, después se analizó la activación de ambos tipos celulares mediante CD69, NKG2D y PD-1



**Figura 28. Análisis de monocitos.** A partir de la población CD14<sup>+</sup> se seleccionaron los monocitos clásicos (CD14<sup>++</sup>CD16<sup>-</sup>), monocitos intermedios (CD14<sup>++</sup>CD16<sup>+</sup>) y los no clásicos (CD14<sup>+</sup>CD16<sup>+</sup>), después se determinó la activación de los tipos celulares mediante CD69, NKG2D, PD-1, CD107a, CTLA-4 y Nkp44. Se muestra el ejemplo de análisis de monocitos clásicos por ser la población más abundante, pero se realizó de la misma manera para los 3 subtipos de monocitos.

#### 4.2.2.1 Biomarcadores al diagnóstico

Para la caracterización de las PBMC's, en el momento del diagnóstico, se tuvo en consideración tanto el porcentaje de positividad para cada marcador, así como los niveles de expresión del mismo receptor indicados por la mediana de intensidad del fluorocromo (MFI, *median fluorescence intensity*). Para aquellos casos donde la población de interés no existía (0%), la señal de MFI por tanto fue nula.

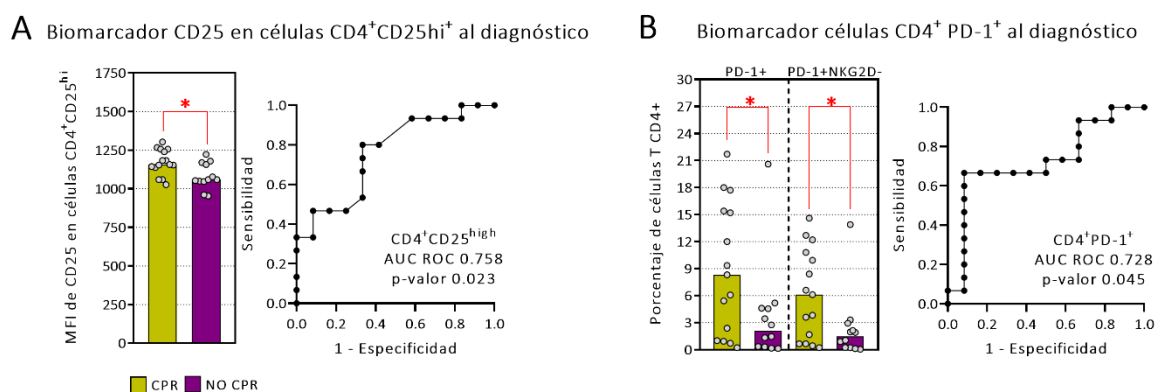
Al diagnóstico no se encontró asociación con la respuesta patológica en ninguna de las subpoblaciones estudiadas de células B (tabla 1, anexo I). A continuación se procede a detallar los cambios significativos en el resto de poblaciones analizadas.

##### **Células T CD4<sup>+</sup>**

Las células T CD4 colaboradoras mostraron diferencias significativas al diagnóstico en los niveles de expresión del receptor de activación CD25 en la población de posibles T reguladoras (CD25<sup>hi</sup>) y en el porcentaje de células CD4 positivas para PD-1 (tabla 2, anexo I).

Los pacientes con CPR tenían niveles más altos de expresión del receptor CD25 en la población seleccionada de CD4<sup>+</sup>CD25<sup>hi</sup>. Este marcador permitía clasificar a los pacientes con CPR con un AUC ROC de 0.758 y un p-valor de 0.023 (figura 29-A).

En cuanto al receptor PD-1, los pacientes con CPR tenían un porcentaje mayor de células CD4<sup>+</sup>PD-1<sup>+</sup> y CD4<sup>+</sup>PD-1<sup>+</sup>NKG2D<sup>-</sup> al diagnóstico. Debido a que estas poblaciones son muy similares (ya que NKG2D se expresa en una proporción muy baja en CD4<sup>+</sup>) se realizó la curva ROC sólo en la población general CD4<sup>+</sup>PD-1<sup>+</sup> y se obtuvo un AUC ROC de 0.728 y un p-valor de 0.045 (figura 29-B).



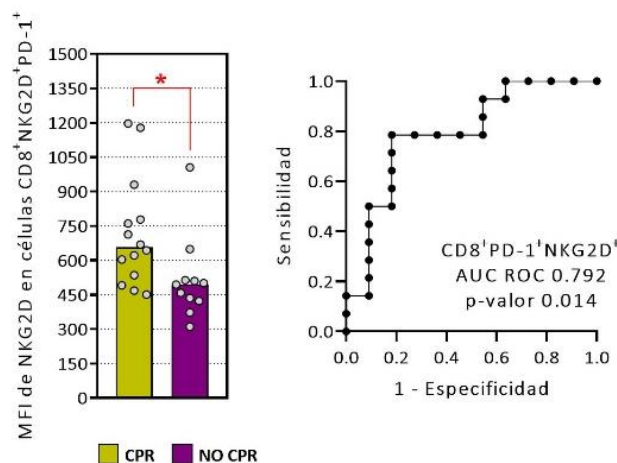
**Figura 29. Biomarcadores en células T CD4.** **A.** Expresión de CD25 en células CD4<sup>+</sup>CD25<sup>hi</sup> y curva ROC de la expresión de CD25 en células CD4<sup>+</sup>CD25<sup>hi</sup>. **B.** Porcentaje de células CD4<sup>+</sup>PD-1<sup>+</sup> y curva ROC de células CD4<sup>+</sup>PD-1<sup>+</sup>. Se representan los datos obtenidos de 27 pacientes, 15 con respuesta completa (CPR, amarillo), 12 con respuesta no completa (No CPR, morado). Se utilizó el test de datos no paramétricos Mann-Whitney (\*p-valor<0.05; \*\*p-valor<0.01; \*\*\*p-valor<0.001) y análisis de curvas ROC donde se muestra el AUC y el p-valor.

### Células T CD8<sup>+</sup>

El estudio de células T CD8 citotóxicas mostró diferencias significativas al diagnóstico en los niveles de expresión del receptor de activación NKG2D en la población CD3<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup> dobles positivas para los receptores NKG2D y PD-1 (tabla 2, anexo I).

Los pacientes con CPR tenían niveles más altos de expresión del receptor de activación NKG2D en las células CD8<sup>+</sup>NKG2D<sup>+</sup>PD-1<sup>+</sup>. Además, este marcador tenía un AUC ROC de 0.792 y un p-valor de 0.014 (figura 30).

Biomarcador NKG2D en células  $CD8^+PD-1^+NKG2D^+$  al diagnóstico



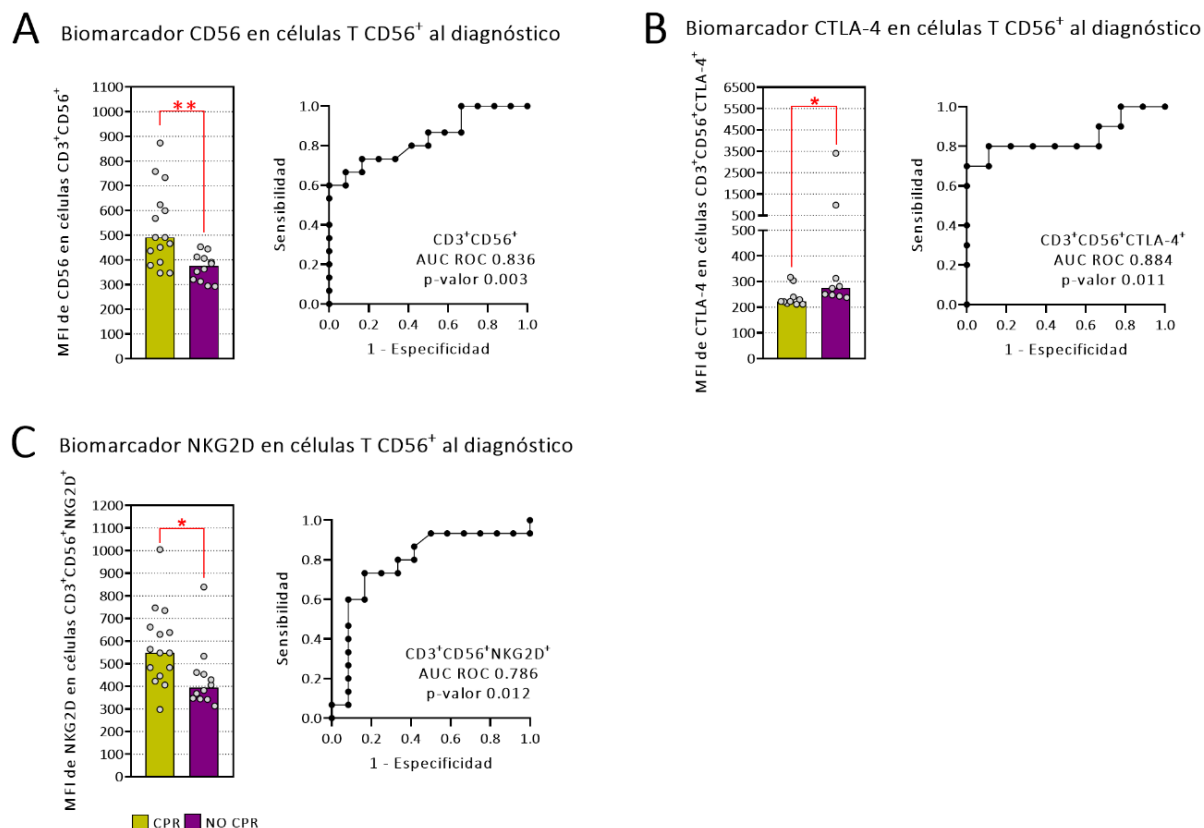
**Figura 30. Biomarcadores en células T CD8.** Expresión de NKG2D en células  $CD8^+NKG2D^+PD-1^+$  y Curva ROC de la expresión de NKG2D en células  $CD8^+NKG2D^+PD-1^+$ . Se representan los datos obtenidos de 25 pacientes, 14 con respuesta completa (CPR, amarillo), 11 con respuesta no completa (No CPR, morado). Se utilizó el test de datos no paramétricos Mann-Whitney (\*p-valor<0.05; \*\*p-valor<0.01; \*\*\*p-valor<0.001) y análisis de curvas ROC donde se muestra el AUC y el p-valor.

### Células T CD56<sup>+</sup>

Al diagnóstico, las células T CD56<sup>+</sup> mostraron diferencias significativas en los niveles de expresión del receptor CD56, CTLA-4 y NKG2D en las poblaciones  $CD3^+CD56^+$ ,  $CD3^+CD56^+CTLA-4^+$  y  $CD3^+CD56^+NKG2D^+$  respectivamente (tabla 3, anexo I).

Los pacientes con CPR tenían niveles más altos de expresión de CD56, que presentó una capacidad de clasificación elevada con un AUC ROC de 0.835 y un p-valor de 0.003 (figura 31-A).

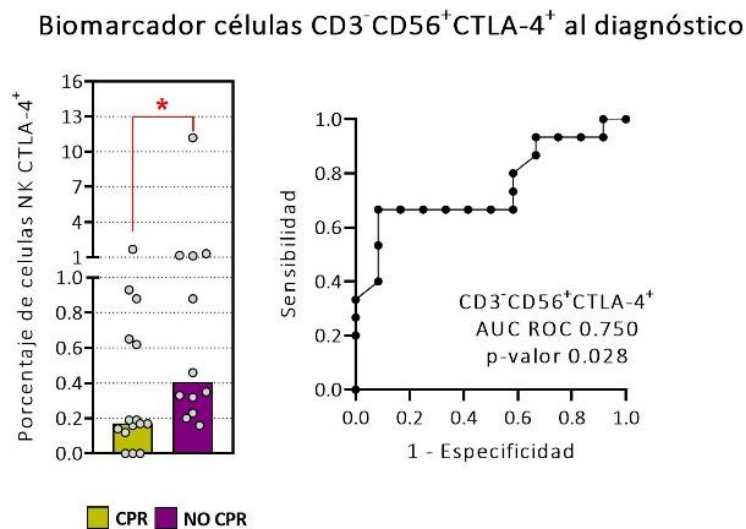
En cuanto al receptor de inhibición CTLA-4, la expresión del mismo fue menor en los pacientes con CPR (figura 31-B). Por el contrario, de manera similar a lo que ocurría con las células CD8, los pacientes con CPR presentaron niveles más elevados de expresión de NKG2D en las células T CD56<sup>+</sup> (figura 31-C). Ambos marcadores son capaces de clasificar a los pacientes con CPR con un AUC ROC de 0.884 (p-valor 0.011) y 0.786 (0.012) respectivamente (figura 31).



**Figura 31. Biomarcadores en células T CD56<sup>+</sup>.** A. Expresión de CD56 y curva ROC de la expresión de CD56. B. Expresión de CTLA-4 y curva ROC de la expresión de CTLA-4. C. Expresión de NKG2D y curva ROC de la expresión de NKG2D. Se representan los datos obtenidos de 27 pacientes, 15 con respuesta completa (CPR, amarillo), 12 con respuesta no completa (No CPR, morado) en A y C. En B se representan 10 pacientes CPR y 9 no CPR. Se utilizó el test de datos no paramétricos Mann-Whitney (\*p-valor<0.05; \*\*p-valor<0.01; \*\*\*p-valor<0.001) y análisis de curvas ROC donde se muestra el AUC y el p-valor.

## Células NK

El estudio de células NK solo mostró diferencias significativas al diagnóstico en el porcentaje de células NK positivas para CTLA-4 (tabla 3, anexo I). Se encontró un menor porcentaje de células CD3<sup>+</sup>CD56<sup>+</sup>CTLA-4<sup>+</sup> en los pacientes con CPR, lo cual clasificaba a los pacientes con CPR con un AUC ROC de 0.750 y un p-valor de 0.028 (figura 32).



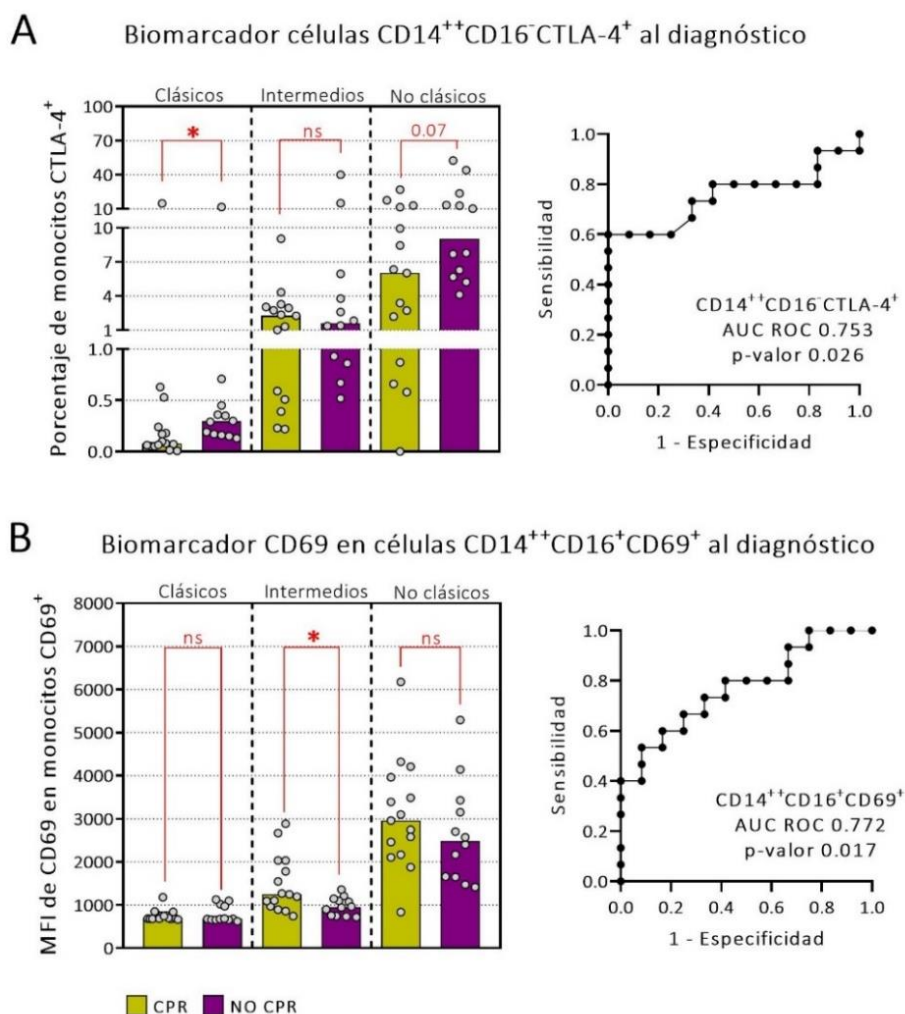
**Figura 32. Biomarcadores en células NK.** Porcentaje de  $CD3^+CD56^+CTLA-4^+$  y curva ROC de células  $CD3^+CD56^+CTLA-4^+$ . Se representan los datos obtenidos de 27 pacientes, 15 con respuesta completa (CPR, amarillo), 12 con respuesta no completa (No CPR, morado). Se utilizó el test de datos no paramétricos Mann-Whitney (\*p-valor<0.05; \*\*p-valor<0.01; \*\*\*p-valor<0.001) y análisis de curvas ROC donde se muestra el AUC y el p-valor.

## Monocitos

Los monocitos clásicos mostraron diferencias significativas al diagnóstico en el porcentaje de monocitos clásicos  $CTLA-4^+$  (tabla 1, anexo I). Aunque los porcentajes fueron muy bajos, los pacientes con CPR tenían un porcentaje menor de monocitos clásicos positivos para  $CTLA-4$  y por el contrario los monocitos intermedios o no clásicos no mostraron diferencias significativas. Al realizar la curva ROC se obtuvo un AUC ROC de 0.753 con un p-valor de 0.026 (figura 33-A).

En monocitos intermedios, de todos los valores analizados (tabla 1, anexo I), los pacientes con CPR mostraron niveles más altos de expresión del marcador de activación temprana  $CD69$  y a su vez esto clasificaba a los pacientes con CPR con un AUC ROC de 0.772 y un p-valor de 0.017 (figura 33-B).





**Figura 33. Biomarcadores en monocitos. A.** Porcentaje de monocitos clásicos, intermedios y no clásicos positivos para  $CTLA-4^{+}$  y curva ROC de células  $CD14^{++}CD16^{-}CTLA-4^{+}$ . **B.** Expresión de CD69 en monocitos clásicos, intermedios y no clásicos y curva ROC de expresión de CD69 en monocitos intermedios. Se representan los datos obtenidos de 27 pacientes, 15 con respuesta completa (CPR, amarillo), 12 con respuesta no completa (No CPR, morado). Se utilizó el test de datos no paramétricos Mann-Whitney (\*p-valor<0.05; \*\*p-valor<0.01; \*\*\*p-valor<0.001) y análisis de curvas ROC donde se muestra el AUC y el p-valor.

Para finalizar, los monocitos no clásicos no mostraron diferencias significativas en ninguna de las subpoblaciones (tabla 1, anexo I).



#### 4.2.2.2 Biomarcadores post tratamiento neo-adyuvante

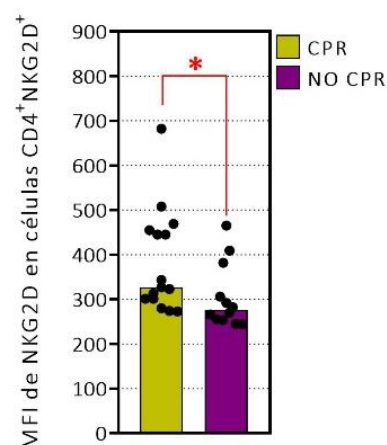
Para el estudio de las PBMC's, después del tratamiento neo-adyuvante, de igual manera que en las muestras al diagnóstico, se examinó tanto el porcentaje de positividad para el marcador de interés, así como los niveles de expresión del mismo receptor indicados por MFI.

Post tratamiento no se distinguió asociación con respuesta patológica en ninguna de las subpoblaciones de células T CD8, células NK o monocitos (tablas 2, 3, 1 del anexo I respectivamente). A continuación se procede a describir los cambios significativos en el resto de poblaciones analizadas.

#### Células T CD4<sup>+</sup>

En las células T CD4 solo se encontraron diferencias significativas post tratamiento en la expresión del receptor de activación NKG2D, tanto en la población CD4<sup>+</sup>NKG2D<sup>+</sup> como en la CD4<sup>+</sup>NKG2D<sup>+</sup>PD-1<sup>-</sup> (tabla 2, anexo I). Debido a que estas poblaciones son muy similares (ya que PD-1 no se detecta post tratamiento) se representan los datos de la población CD4<sup>+</sup>NKG2D<sup>+</sup>. Los pacientes con CPR presentaron niveles de niveles más elevados de expresión de NKG2D (figura 34).

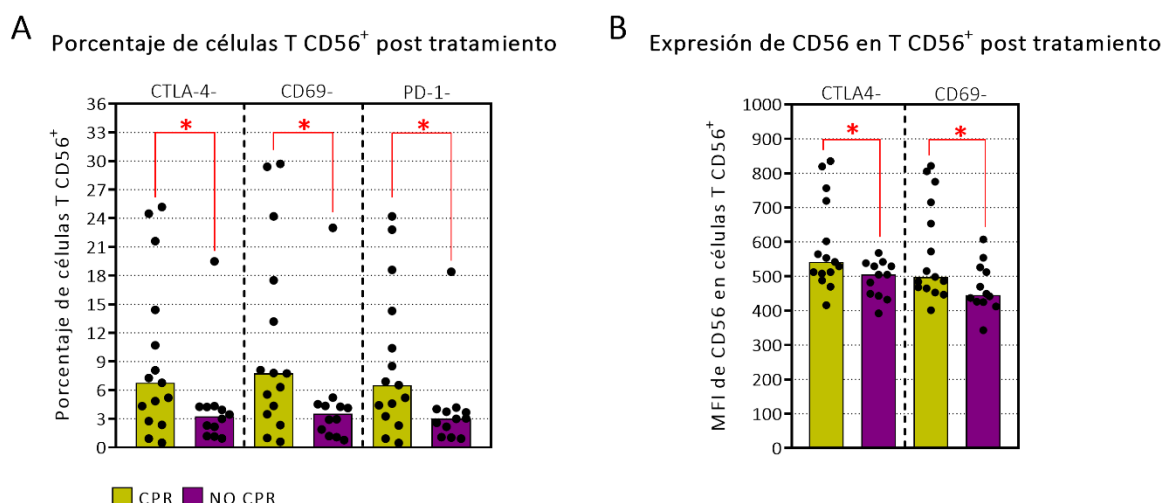
Expresión de NKG2D en células CD4<sup>+</sup>NKG2D<sup>+</sup> post tratamiento



**Figura 34. Células T CD4 post tratamiento asociadas a respuesta patológica.** Expresión de NKG2D en células T CD4. Se representan los datos obtenidos de 27 pacientes, 15 con respuesta completa (CPR, amarillo), 12 con respuesta no completa (No CPR, morado). Se utilizó el test de datos no paramétricos Mann-Whitney (\*p-valor<0.05; \*\*p-valor<0.01; \*\*\*p-valor<0.001).

### Células T CD56<sup>+</sup>

Al analizar las células T CD56<sup>+</sup> después del tratamiento neo-adyuvante se observó un porcentaje mayor de estas células negativas para receptores de inhibición y activación como son CTLA-4, CD69 y PD-1 en los pacientes con CPR (figura 35-A). Además, estos pacientes también tienen niveles más altos de expresión de CD56 en las poblaciones CTLA-4<sup>-</sup> y CD69<sup>-</sup> (figura 35-B).

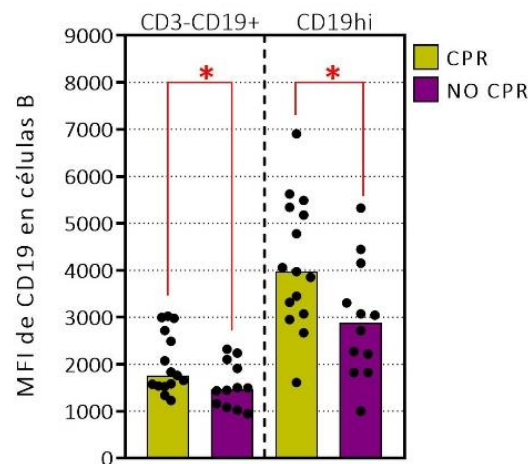


**Figura 35. Células T CD56 post tratamiento asociadas a respuesta patológica.** **A.** Porcentaje de células T CD56<sup>+</sup> negativas para los receptores CTLA-4, CD69 y PD-1. **B.** Expresión de CD56 en células T CD56<sup>+</sup> negativas para CTLA-4 y CD69. Se representan los datos obtenidos de 27 pacientes, 15 con respuesta completa (CPR, amarillo), 12 con respuesta no completa (No CPR, morado). Se utilizó el test de datos no paramétricos Mann-Whitney (\*p-valor<0.05; \*\*p-valor<0.01; \*\*\*p-valor<0.001).

### Células B

En las células B post tratamiento se observaron diferencias significativas en la expresión de CD19 (tabla 1 del anexo I). Los pacientes con CPR presentaron niveles más elevados de este receptor tanto en la población de células B total (CD3<sup>+</sup>CD19<sup>+</sup>) como en las células CD19<sup>hi</sup> (figura 36).

## Expresión de CD19 en células B post tratamiento

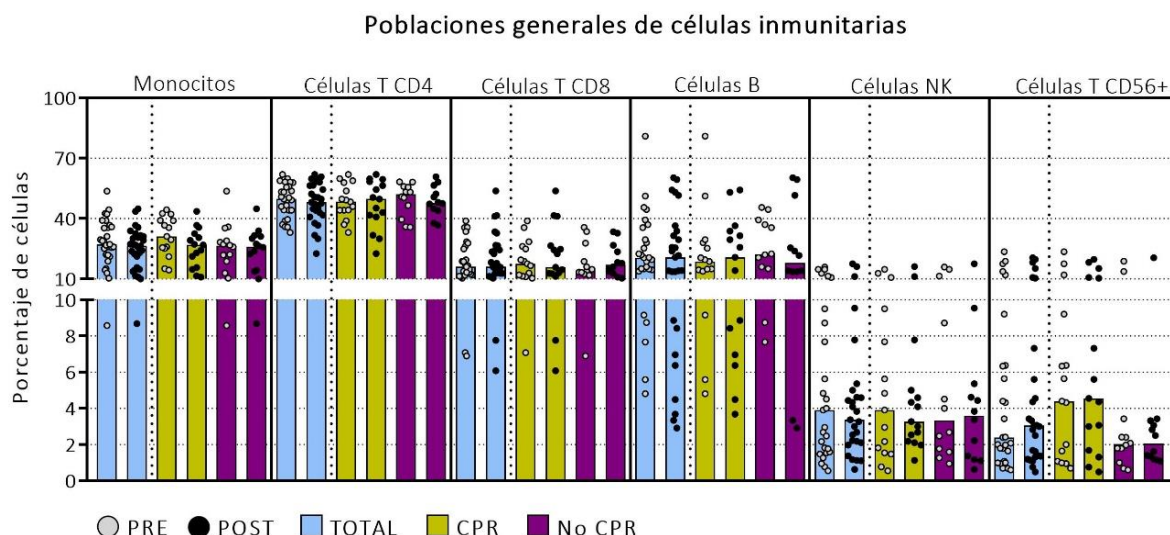


**Figura 36. Células B post tratamiento asociadas a respuesta patológica.** Expresión de CD19 en células B y células CD19<sup>hi</sup>. Se representan los datos obtenidos de 27 pacientes, 15 con respuesta completa (CPR, amarillo), 12 con respuesta no completa (No CPR, morado). Se utilizó el test de datos no paramétricos Mann-Whitney (\*p-valor<0.05; \*\*p-valor<0.01; \*\*\*p-valor<0.001).

#### 4.2.2.3 Variación en biomarcadores tras el tratamiento neo-adyuvante

Cómo se ha comentado previamente, debido al elevado número de marcadores estudiados, se describen solamente aquellos con diferencias significativas. Se muestra la comparación entre muestra al diagnóstico y post tratamiento de una manera global y por respuesta patológica (tabla 4, 5 y 6, anexo I).

En primer lugar se muestran las poblaciones generales inmunitarias, aunque no se apreciaron diferencias significativas con el tratamiento, ni globalmente ni por respuesta patológica (figura 37).

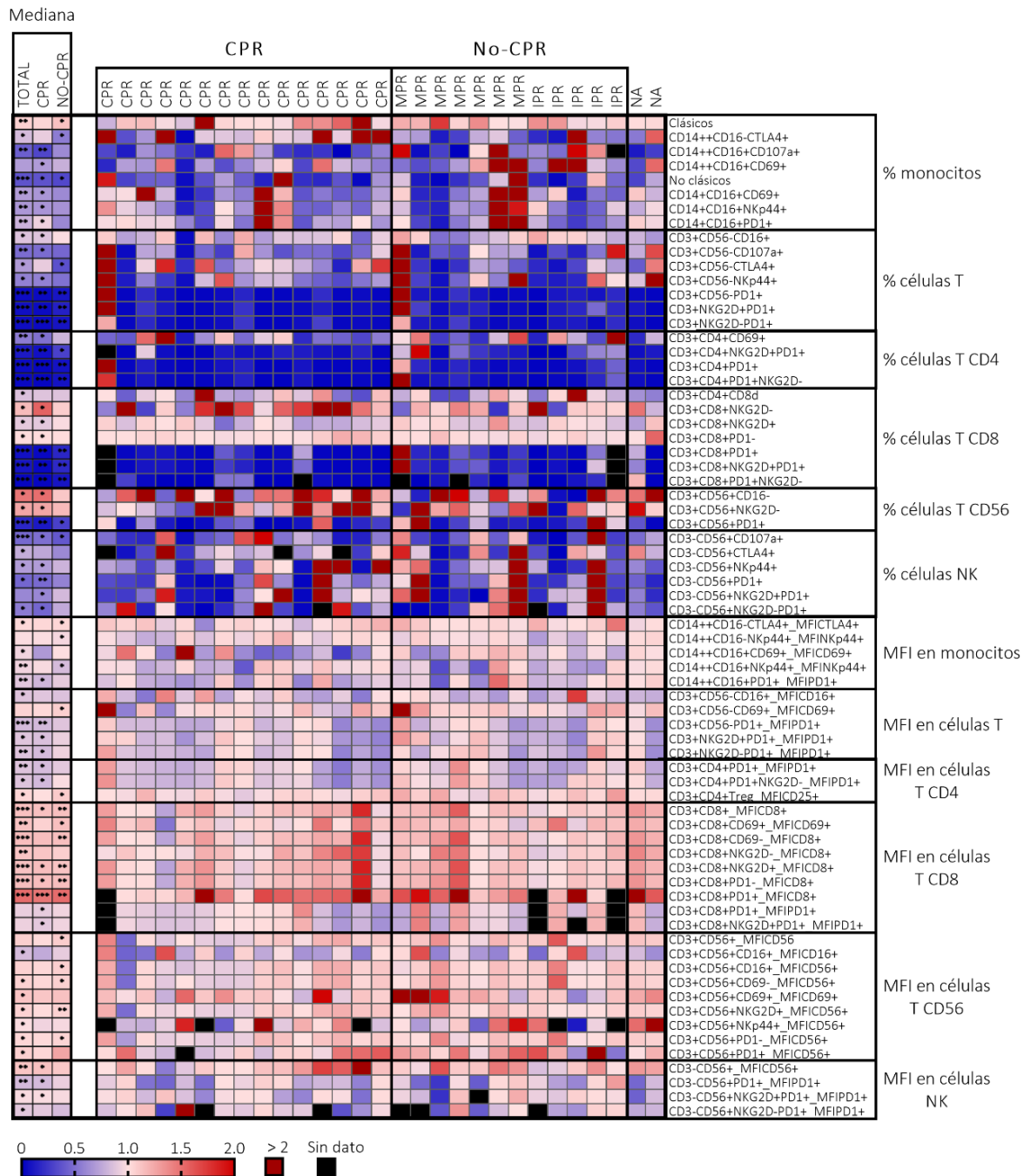


**Figura 37. Efecto del tratamiento en poblaciones inmunitarias.** Se incluyen monocitos, células T CD4, células T CD8, células B, células NK y células T CD56<sup>+</sup>. Se representan los datos obtenidos de 29 pacientes (TOTAL, azul), de 15 con respuesta completa (CPR, amarillo) y 12 con respuesta no completa (No CPR, morado). Se utilizó el test de datos no paramétricos Wilcoxon (\*p-valor<0.05; \*\*p-valor<0.01; \*\*\* p-valor<0.001).

En segundo lugar, al profundizar en los subtipos celulares, sí se detectaron cambios significativos debidos al tratamiento neo-adyuvante. Independientemente de la respuesta patológica, post tratamiento se observó una disminución del porcentaje en la mayoría de las subpoblaciones excepto para CD8<sup>+</sup>PD-1<sup>-</sup>, CD8<sup>+</sup>NKG2D<sup>-</sup>, CD3<sup>+</sup>CD56<sup>+</sup>CD16<sup>+</sup> y CD3<sup>+</sup>CD56<sup>+</sup>NKG2D<sup>-</sup> (figura 38). Adicionalmente estas poblaciones aumentaron solo en los pacientes con CPR. Los monocitos intermedios y no clásicos que expresan CD69 disminuyeron post tratamiento de manera significativa solo en los pacientes con CPR (figura 38).

No obstante, al estudiar la expresión de estos marcadores en las diferentes subpoblaciones por su MFI, de manera global todos los pacientes disminuyeron la detección de PD-1 en monocitos, células CD4, células CD8 y células NK (figura 38). También se encontró un aumento en la expresión del receptor CD8 en la membrana celular de las propias células T CD8. Para finalizar, al profundizar en la expresión de CD56 en las células NK se produjo un aumento significativo en todos los pacientes post tratamiento, el cual al estratificar por

respuesta patológica solo se produjo en los pacientes con CPR. Sin embargo, este mismo receptor en las células T CD56<sup>+</sup> solo aumentó de manera significativa en los pacientes con no CPR (figura 38).



**Figura 38. Efecto del tratamiento en subpoblaciones de células inmunitarias.** Se expresa el porcentaje (%) y la expresión (MFI, intensidad de la señal). Se representa el fold change (post/pre) de 29 pacientes (TOTAL), de 15 con respuesta completa (CPR) y 12 con respuesta no completa (NO-CPR), así como de cada paciente de manera individual. Se utilizó el test de datos no paramétricos Wilcoxon (\*p-valor<0.05; \*\*p-valor<0.01; \*\*\*p-valor<0.001).

### 4.2.3 Factores solubles en sangre

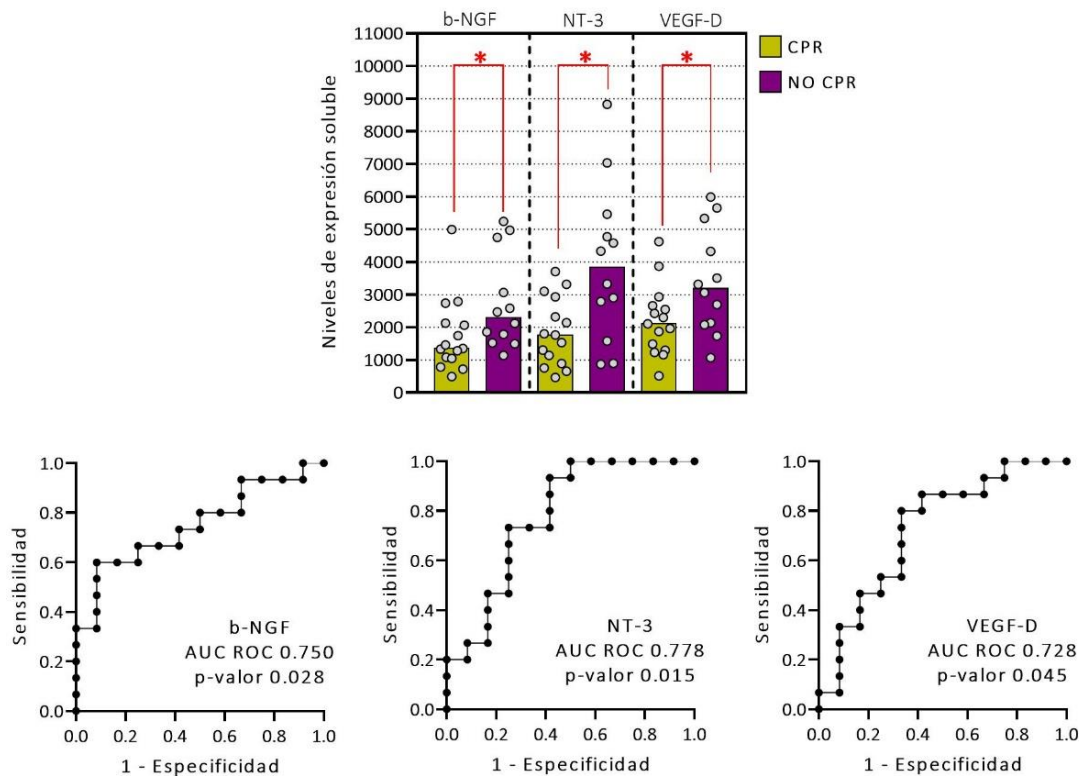
Este apartado se centra en los resultados obtenidos a partir del plasma de los pacientes en la muestra al diagnóstico y después del tratamiento neo-adyuvante. Se obtuvieron resultados de 200 citoquinas (Array de citoquinas) y 16 factores solubles (Miliplex).

#### 4.2.3.1 Biomarcadores al diagnóstico

De los 16 factores solubles y las 200 citoquinas estudiadas al diagnóstico para su valor predictivo, sólo 3 citoquinas tuvieron una asociación con la respuesta patológica al diagnóstico (tabla 7 y 8 del anexo I).

Se observó que los niveles de secreción de las neurotrofinas b-NGF, NT-3 y el factor de crecimiento endotelial VEGF-D eran más bajos en pacientes con CPR en comparación con no CPR (figura 39). Además, el uso de estas citoquinas solubles como posibles marcadores predictivos de respuesta patológica se demostró mediante el análisis de curvas ROC, donde se obtuvo un AUC ROC de 0.750 (p-valor 0.028) para b-NGF, 0.778 (p-valor 0.015) para NT-3 y 0.728 (p-valor 0.045) para VEGF-D (figura 39).

Biomarcadores solubles al diagnóstico: factor de crecimiento nervioso (b-NGF), neurotrofina 3 (NT-3) y factor de crecimiento endotelial (VEGF-D)



**Figura 39. Citoquinas al diagnóstico asociadas a respuesta patológica.** Niveles de expresión de b-NGF, NT-3 y VEGF-D y curvas ROC de b-NGF, NT-3 y VEGF-D. Se representan los datos obtenidos de 27 pacientes, 15 con respuesta completa (CPR, amarillo), 12 con respuesta no completa (No CPR, morado). Se utilizó el test de datos no paramétricos Mann-Whitney (\*p-valor<0.05; \*\*p-valor<0.01; \*\*\*p-valor<0.001) y análisis de curvas ROC donde se muestra el AUC y el p-valor.

#### 4.2.3.2 Biomarcadores post tratamiento neo-adyuvante

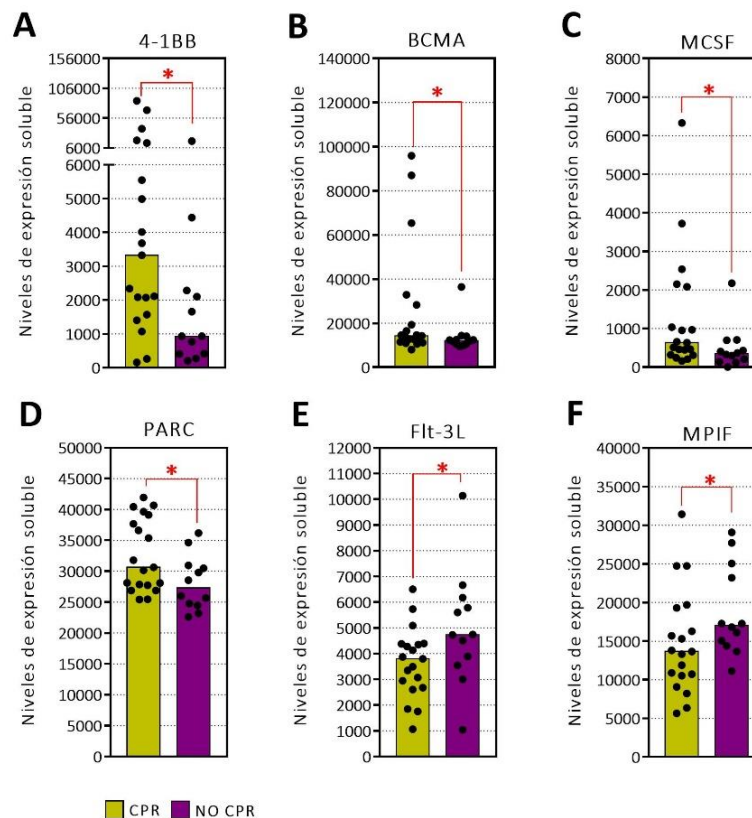
No se encontraron diferencias significativas asociadas a respuesta patológica (tabla 7 del anexo I) en los 16 factores solubles analizados y solo 6 citoquinas mostraron diferencias entre pacientes CPR y no CPR después del tratamiento neo-adyuvante (tabla 8 del anexo I).

Los pacientes con CPR presentaron niveles más elevados de la citoquina secretada por linfocitos activados, 4-1BB (figura 40-A), del factor de maduración de células B, BCMA (figura 40-B), del factor estimulador de colonias de macrófagos, MCSF (figura 40-C) y del factor de regulación pulmonar y activación, PARC (figura 40-D).



De manera contraria, el factor de crecimiento de células inmunitarias Flt-3L, crucial para las células dendríticas (figura 40-E) y el factor de inhibición mieloide progenitora MPIF (figura 40-F) eran más bajos en pacientes con CPR.

Niveles de expresión de biomarcadores solubles post tratamiento



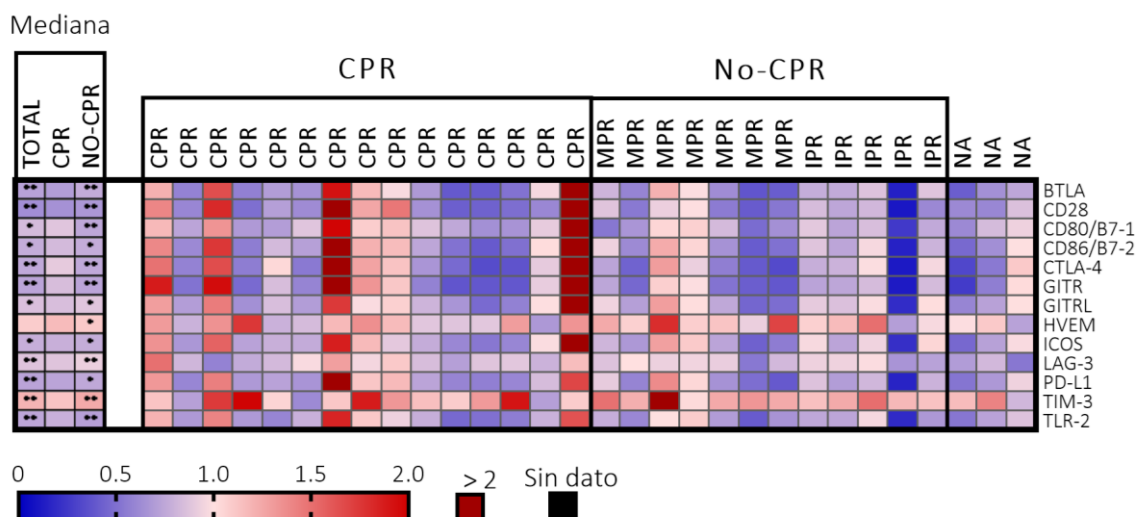
**Figura 40. Citoquinas post tratamiento asociadas a respuesta patológica.** A. Niveles de expresión de 4-1BB. B. Niveles de expresión de BCMA. C. Niveles de expresión de MCSF. D. Niveles de expresión de PARC. E. Niveles de expresión de Flt-3L. F. Niveles de expresión de MPIF. Se representan los datos obtenidos de 31 pacientes 19 con respuesta completa (CPR, amarillo), 12 con respuesta no completa (No CPR, morado). Se utilizó el test de datos no paramétricos Mann-Whitney (\*p-valor<0.05; \*\*p-valor<0.01; \*\*\* p-valor<0.001).

#### 4.2.3.3 Variación en biomarcadores tras el tratamiento neo-adyuvante

De la misma forma que en apartados anteriores, debido al elevado número de citoquinas y factores solubles estudiados, se describen solamente aquellas donde se obtuvieron diferencias significativas. Se muestra la comparación entre muestra al diagnóstico y post tratamiento de una manera global y por respuesta patológica.

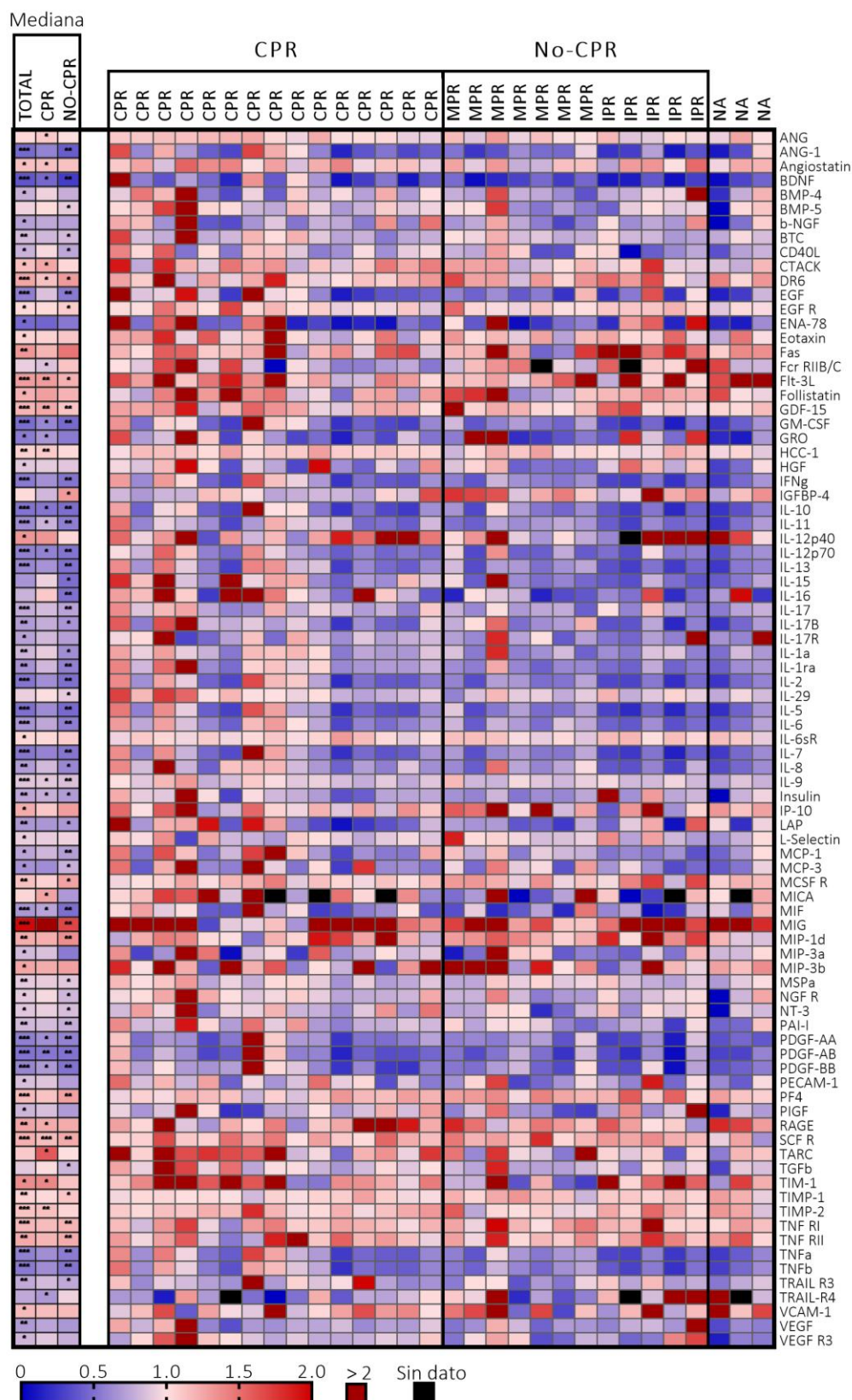


Los factores solubles CD27, CD40 y PD-1 no mostraron diferencias significativas (tabla 9, anexo I). Los demás factores solubles, excepto HVEM y TIM-3, disminuyeron post tratamiento en todos los pacientes independientemente de la respuesta patológica y esta disminución se mantuvo significativa solo en los pacientes con no CPR (figura 41).



**Figura 41. Efecto del tratamiento en factores solubles.** Se representa el incremento (post/pre) de 30 pacientes (TOTAL), de 15 con respuesta completa (CPR) y 12 con respuesta no completa (NO-CPR), así como de cada paciente de manera individual. Se utilizó el test de datos no paramétricos Wilcoxon (\*p-valor<0.05; \*\*p-valor<0.01; \*\*\*p-valor<0.001).

Para finalizar, un alto número de citoquinas variaron tras el tratamiento, pero por el objetivo del trabajo nos centraremos exclusivamente en los cambios de los pacientes con CPR (tabla 10, anexo I). Los pacientes con CPR presentaron un aumento de ANG (p-valor 0.027), Angiostatin (p-valor 0.041), CTACK (p-valor 0.031), HCC-1 (p-valor 0.001), MICA (p-valor 0.041), RAGE (p-valor 0.041), TARC (p-valor 0.020), TIM-1 (p-valor 0.020), TIMP-2 (p-valor 0.003). Y por el contrario un descenso de FcγRIIb/C (p-valor 0.045), GRO (p-valor 0.036) and TRAIL-R4 (p-valor 0.041) como se refleja en la figura 42.



**Figura 42. Efecto del tratamiento en citoquinas.** Se representa el incremento (post/pre) de 30 pacientes (TOTAL), de 15 con respuesta completa (CPR) y 12 con respuesta no completa (NO-CPR), así como de cada paciente de manera individual. Se utilizó el test de datos no paramétricos Wilcoxon (\*p-valor<0.05; \*\*p-valor<0.01; \*\*\* p-valor<0.001).

# Capítulo 5

## Discusión

### 5 DISCUSIÓN

---

La inmunoterapia en monoterapia o en combinación con quimioterapia está revolucionando los tratamientos oncológicos en los pacientes con estadios localmente avanzados debido a las elevadas tasas de respuestas patológicas completas en CPCNP, pudiendo ser este tipo de respuesta uno de los subrogados más potentes de supervivencia que hay descritos.

El primer estudio publicado que demostró la eficacia del nivolumab (anti-PD-1) en estadios I-IIIa obtuvo unas tasas de MPR del 45%, de las cuales un 13% fueron CPR (Forde et al. 2018). Existen varios ensayos clínicos en marcha que valoran la eficacia de la inmunoterapia en estadios iniciales, como el LCMC3 (Kwiatkowski et al. 2019) o el PRINCEPS (Besse et al. 2020), con prometedores resultados preliminares generando tasas de respuestas patológicas mayores entre el 20% y el 44%. Hasta la fecha solo han sido publicados ensayos clínicos utilizando la combinación de anti-PD-L1 con quimioterapia (Shu et al. 2020), anti-PD-1 con quimioterapia (Provencio et al. 2020), anti-PD1 en monoterapia o con anti-CTLA-4 (Cascone et al. 2021) y anti-PD-1 con anti-CTLA-4 que tuvo que ser finalizado por toxicidad (Reuss et al. 2020).

El ensayo clínico NADIM es el único centrado en estadios IIIA. Todos los mencionados anteriormente incluyen estadios iniciales I-III, lo cual podría incrementar las tasas de

respuesta debido a la enfermedad menos avanzada. Por esto, el ensayo clínico NADIM es el que ha demostrado con más homogeneidad, la seguridad y la actividad del uso de nivolumab más quimioterapia en estadios IIIA de CPCNP, alcanzando una remisión completa del tumor en el 63% de los pacientes en el momento de la cirugía. De hecho, algunos de los pacientes incluidos en el ensayo clínico, en la actualidad con la nueva clasificación 8th del TNM, se considerarían estadio IIIB (estadio con peor pronóstico) y aun así se beneficiaron del tratamiento con quimio-inmunoterapia neo-adyuvante. Además, el tratamiento de quimio-inmunoterapia podría potenciar el uso de CPR como subrogado de supervivencia a largo plazo, ya que los pacientes con CPR tienen una SLP y SG mayor que los pacientes con MPR o IPR (Hellmann et al. 2014; Pöttgen et al. 2015; Qu et al. 2019).

El planteamiento de esta tesis doctoral es novedoso y difiere bastante de trabajos previos. Existen numerosos estudios centrados en la búsqueda de biomarcadores en pacientes con estadios avanzados, los cuales no suelen ser operados y por tanto la relación con la respuesta patológica no puede ser determinada. Por otro lado, la respuesta patológica no correlaciona perfectamente con la respuesta clínica por imagen en estadios localmente avanzados (Provencio et al. 2020) dificultando la comparación entre estudios. Por lo tanto, pese a esta limitación debida a la falta de estudios previos en estadios resecables, en la presente tesis se discuten los biomarcadores obtenidos asociados a respuesta patológica con los ya descritos como factores de buen pronóstico, ya sea en respuesta clínicas o supervivencia.

### **Análisis hematológico**

A pesar de su importancia clínica, por el momento no existen estudios centrados en la búsqueda de biomarcadores de CPR en pacientes con CPCNP tratados con terapia neo-adyuvante en sangre periférica, probablemente debido a la baja tasa de CPR en la práctica clínica hasta el momento. Sin embargo, sí se han asociado diferentes parámetros bioquímicos en sangre periférica con tasas de respuestas o supervivencias. Se ha señalado que los parámetros derivados de hemogramas como NLR, dNLR, LDH o LIPI se asociaban a SLP y SG en estadios avanzados de CPCNP tratados con inhibidores de PD-1/PD-L1 (Mezquita et al. 2018; Inomata et al. 2020; L Rapoport et al. 2020) y a las tasas de respuestas por imagen (Mazzaschi et al. 2020). En el presente trabajo aunque los ratios NLR, dNLR, PLR, M:L

no mostraron asociación con la respuesta patológica ni al diagnóstico ni post tratamiento, sí se observa una disminución de los mismos con el tratamiento neo-adyuvante. Esta reducción generalizada debida al tratamiento neo-adyuvante también se aprecia en las células analizadas en los hemogramas, como las plaquetas, leucocitos, neutrófilos, monocitos o eosinófilos, lo cual se suele asociar a la toxicidad hematológica debido al tratamiento con quimioterapia (Sociedad Española de Oncología Médica 2019). Aun así, solo 4 pacientes desarrollaron neutropenia durante la neo-adyuvancia (Provencio et al. 2020) indicando que, aun cuando se produzca una reducción generalizada, esta no es patológica en la mayoría de los pacientes.

### **Expresión de PD-1 en linfocitos como posible factor pronóstico**

En adición a los hemogramas, en la práctica clínica de los tumores sólidos se está estableciendo el uso de la infiltración inmunitaria celular en tejido tumoral como fuente importante de biomarcadores pronósticos (Senovilla et al. 2012). En melanoma (Tumeh et al. 2014) o en CPCNP (Uryvaev et al. 2018) se ha identificado un mayor infiltrado de células T CD8 al diagnóstico y post tratamiento con anti-PD1 en pacientes con mejores respuestas al tratamiento. Sin embargo, en el presente trabajo se detectó una menor infiltración de linfocitos T y linfocitos T CD8 post tratamiento en aquellos pacientes con CPR. No obstante, a diferencia de estos estudios que relacionaban el infiltrado celular con respuestas patológicas mayores, ya que era la respuesta patológica más común, en la presente tesis se relaciona con respuestas patológicas completas. En cuanto a la infiltración linfocitaria de los pacientes con MPR sí se observó un mayor número de células CD8<sup>+</sup> y CD8 activadas (granzima B<sup>+</sup>) post tratamiento en comparación a CPR y por tanto, la menor infiltración encontrada en los pacientes con CPR podría estar indicando que la respuesta inmunitaria sucedió previamente al momento de la cirugía por lo que los linfocitos ya no se encuentran en el lecho tumoral.

Cabe mencionar que la validez de los biomarcadores descritos en pacientes tratados con anti-PD(L)1 puede verse comprometida cuando el tratamiento se combina con quimioterapia. De hecho, se ha descrito que la quimioterapia puede afectar a la respuesta inmunitaria antitumoral promoviendo la infiltración de células T y B junto con un cambio hacia un fenotipo citotóxico de las células T CD8 y T CD4 en el microambiente tumoral

(Gaudreau et al. 2020), así como altos niveles de PD-1 en las células T y un mayor número de células T CD4 y CD68 infiltradas (Parra et al. 2018). La expresión de PD-1 por las células inmunitarias infiltradas en el tejido tumoral previo al tratamiento estaría indicando una especificidad de las mismas a antígenos tumorales, de tal manera que una vez eliminado el bloqueo causado por la unión de PD-1 con PD-L1, los TILs podrían tener más capacidad para eliminar el tumor. De hecho, aunque en nuestro estudio no hubo diferencias significativas en la expresión de PD-1 en los TILs pre tratamiento, se pudo apreciar un mayor infiltrado de células T PD-1<sup>+</sup> en los pacientes con CPR. Estos resultados podrían indicar que, efectivamente, un mayor número de TILs PD-1<sup>+</sup> en el momento del diagnóstico podría ser un factor de buen pronóstico.

En cuanto a las subpoblaciones inmunitarias analizadas en PBMCs, se detectó un mayor porcentaje de células inmunitarias PD-1<sup>+</sup> tanto en las células T como en las células NK en los pacientes con CPR al diagnóstico. Esta tendencia fue estadísticamente significativa en las células T CD4, sin embargo estas diferencias no se observaron en las T CD8, en contraposición a otros trabajos en los que niveles altos de células CD8<sup>+</sup>PD-1<sup>+</sup> estuvieron asociados a una mayor SLP y SG (Mazzaschi et al. 2019). Además, se ha descrito la importancia de la proliferación temprana de las células PD-1<sup>+</sup>, principalmente las células T CD8, en pacientes con CPCNP después del tratamiento con anti-PD-1 (Kamphorst et al. 2017; Kim et al. 2019) y cómo la inmunoterapia neo-adyuvante aumentaba los linfocitos T CD8 específicos del tumor en sangre periférica (Liu et al. 2016).

La expresión de PD-1 se asocia a linfocitos T exhaustos debido a una estimulación crónica (Topalian et al. 2016), probablemente por parte del tumor. Este fenotipo puede ser revertido en algunos casos mediante la administración de anti-PD-1 (Zou, Wolchok y Chen 2016). Otros estudios, por el contrario, han indicado que la administración de anti-PD-1 no revierte el fenotipo exhausto (Goods et al. 2017). En la presente tesis la expresión de PD-1 en los linfocitos T CD4 en sangre periférica en el momento del diagnóstico en los pacientes con CPR podría estar indicando la activación tras el reconocimiento antigénico así como un fenotipo exhausto (Inomata et al. 2019). Estos resultados podrían implicar la existencia a nivel sistémico de una respuesta inmunitaria antitumoral pre-existente pero exhausta, que se desencadenaría en el momento de la administración del fármaco anti-PD-1. Además,

aunque no de manera significativa, el mayor número de los linfocitos T CD8, T CD56<sup>+</sup> y NK positivos para PD-1 en el momento del diagnóstico en los pacientes con CPR podría explicar la especificidad antitumoral de estos linfocitos y la capacidad de responder una vez recibido el tratamiento anti-PD-1. Aunque en la presente tesis no se analizaron las células CD4<sup>+</sup>PD-1<sup>+</sup> infiltradas en la zona tumoral, con los resultados obtenidos en sangre periférica se podría sugerir la importancia de este tipo celular en los pacientes con CPCNP (Gu et al. 2019).

La presencia de TILs PD-1<sup>+</sup> post tratamiento con tratamiento anti-PD1 está asociado a un elevado riesgo de muerte (Mazzaschi et al. 2018; Zappasodi et al. 2018). En nuestro estudio se observaron resultados similares mediante una detección significativa mayor de TILs PD-1<sup>+</sup> de los pacientes con IPR después del tratamiento neo-adyuvante. Esto podría ser indicativo de la especificidad celular y capacidad de eliminar por completo el tumor, ya que de hecho los pacientes con MPR o IPR presentaban un mayor número de células T PD-1<sup>+</sup> post tratamiento. Sin embargo, existe cierta controversia en cuanto a la detección de PD-1 post tratamiento con fármacos anti-PD-1, debido a que hay clones de anticuerpos que compiten con el nivolumab por su unión al receptor, como podrían ser los usados en la presente tesis en tejido y en sangre periférica. De los clones comercialmente disponibles, hasta la fecha solo el clon MIH4 (BD Biosciences) es capaz de detectar PD-1 después del tratamiento con anti-PD-1 (Zelba et al. 2018). Esto implica que los resultados y conclusiones en cuanto a la detección de PD-1 han de ser interpretados con cautela, ya que por ejemplo, la menor detección de células T PD-1<sup>+</sup> post tratamiento neo-adyuvante en el área tumoral de los pacientes con CPR podría deberse a una mayor ocupación de sus receptores PD-1 por parte del nivolumab, o por una menor presencia de este tipo de células. En cualquier caso, sí que parece interesante que existan posibles diferencias en la detección de células PD-1<sup>+</sup> entre los grupos de respuesta patológica.

### **Linfocitos T memoria y células T reguladoras**

De manera similar a otros estudios sí se pudo apreciar, aunque no de manera significativa, un mayor número de células T memoria en el tumor en el momento del diagnóstico como indicador de buen pronóstico en los pacientes con CPR (Duan et al. 2015; Forde et al. 2018). Que las células T memoria se mantengan elevadas en el tejido tumoral de pacientes con CPR post tratamiento podría indicar que se trate de células T memoria efectoras, pero con los

marcadores utilizados no podemos definir qué tipo de células T memoria son. En cualquier caso, la presencia elevada de células T memoria en los pacientes con CPR o MPR tras el tratamiento neo-adyuvante podrían indicar una respuesta antitumoral más potente, así como una posible memoria inmunológica a largo plazo que estaría asociada con una menor tasa de recaídas (Ribas et al. 2016; Waldman, Fritz y Lenardo 2020).

Otra población de células T que parece ser característica del estado basal del sistema inmunitario de los pacientes con CPR son las células T reguladoras. En esta tesis doctoral se ha descrito el posible valor predictivo de este tipo celular en sangre periférica al diagnóstico, así como se encontró una asociación entre la infiltración en tejido de estas células T reguladoras post tratamiento y la respuesta patológica en los pacientes con CPR.

La presencia de células T reguladoras en sangre periférica se ha descrito como factor de mal pronóstico ya que están involucradas en la patogénesis del tumor (Hu et al. 2019), no obstante en CPCNP se han relacionado con respuestas clínicas favorables a terapias anti-PD-1 (Koh et al. 2020). En el presente trabajo los pacientes que presentaban niveles más elevados de células CD4<sup>+</sup>CD25<sup>hi</sup> al diagnóstico respondieron mejor al tratamiento y fueron capaces de eliminar en su totalidad el tumor, de manera similar a lo que sucede en melanoma (Martens et al. 2016). Este aumento de células T reguladoras de forma basal podría estar indicando una mayor inmunogenicidad del tumor en los pacientes que alcanzan CPR. Estos pacientes presentarían un mayor control negativo de la respuesta inmunitaria (para evitar procesos de autoinmunidad) como consecuencia de la estimulación crónica por parte del tumor (Soo et al. 2018), que no consigue ser eliminado de forma natural. Cabe mencionar que en la citometría de flujo no se utilizó el marcador FOXP3 característico de las células T reguladoras y por tanto, aunque están caracterizadas con una expresión muy elevada de CD25 que indica su actividad supresora (Baecher-Allan et al. 2001), también podrían ser un subfenotipo de células T CD4 activadas (Waldmann 1991; Garcia, DiSanto y Stockinger 1999).

Por otro lado, los niveles elevados de células T reguladoras infiltradas en el tejido tumoral post tratamiento así como los niveles elevados de 4-1BB, secretado principalmente por las células T reguladoras (Luu, Shao y Schwarz 2020), en los pacientes con CPR podría indicar el cese de la respuesta antitumoral mediante su función de auto-tolerancia inmunitaria



(Sakaguchi et al. 2006). Adicionalmente, los únicos dos factores solubles que aumentaron post tratamiento son HVEM y TIM-3. TIM-3 ha sido descrito como un regulador inmunitario en TILs expresado por células T reguladoras, relacionado con metástasis o estadios avanzados de enfermedad (Gao et al. 2012), así como asociado a la interacción MDSC-Treg en la inmunosupresión del microambiente tumoral (Haist et al. 2021). HVEM se encuentra sobreexpresado en las células tumorales de pacientes con CPCNP con presencia de metástasis (Ren et al. 2018) y está asociado a la progresión de la enfermedad en pacientes con cáncer gástrico (Heo et al. 2012). El aumento significativo de HVEM y TIM-3 en los pacientes con no-CPR podría indicar que estos pacientes no habrían eliminado por completo el tumor y, por tanto, su sistema inmunitario estaría siendo evadido por el tumor.

Es preciso destacar que la presencia elevada de estas células T reguladoras también podría ser un elemento de bloqueo de la respuesta inmunitaria que permitiría la evasión por parte del tumor (Qiu et al. 2019). Sin embargo, estos mecanismos de regulación negativa, como son la expresión de PD-1 en los linfocitos o la presencia de T reguladoras, parecen ser una ventaja ante el tratamiento con anti-PD-1 en los pacientes tratados con quimio-inmunoterapia neo-adyuvante. Estos resultados podrían indicar que los pacientes con CPR tendrían un sistema inmunitario predispuesto a generar una respuesta inmunitaria antitumoral más efectiva pero que está siendo controlada para no generar una activación perjudicial para el organismo.

### **Fenotipo activado de linfocitos T**

Además de las células T memoria y T reguladoras, las células T que expresan el receptor de activación NKG2D parecen ser relevantes en la respuesta antitumoral en los pacientes con CPCNP tratados con quimio-inmunoterapia neo-adyuvante ya que, al diagnóstico en sangre periférica, existe una mayor expresión del receptor NKG2D en las células T CD56<sup>+</sup>. Adicionalmente, aunque no de manera significativa, en el momento del diagnóstico también se aprecia una mayor expresión del receptor NKG2D en las células T CD8.

Las células T CD56<sup>+</sup> son una población linfoide minoritaria de la sangre periférica y todavía no se conocen todas sus funciones, pero dependiendo de su fenotipo podrían generar respuestas antitumorales o facilitar la progresión del tumor (Krijgsman, Hokland y Kuppen

2018). La mayoría de estudios en tumores sólidos hacen referencia a la capacidad de las células T CD56<sup>+</sup> de generar respuestas antitumorales; por ejemplo, niveles altos de células T CD56<sup>+</sup> está asociado a mejores supervivencias en cáncer de cabeza y cuello (Molling et al. 2007) y colon (Krijgsman et al. 2019), lo que apoyaría los resultados obtenidos por el presente trabajo. De manera similar a otros grupos de investigación (Youn et al. 2020), no se encontraron diferencias significativas en los porcentajes globales de células T CD56<sup>+</sup>, no obstante, sí se observó una mayor expresión de los receptores NKG2D y CD56 en los pacientes con CPR. Aunque el receptor CD56 se usa para la clasificación de las células NK, también se puede utilizar como un marcador de activación asociado a una función efectora de las células NK y células T (Van Acker et al. 2017). Por lo tanto, la alta expresión de CD56 y NKG2D en las células T CD56<sup>+</sup> de pacientes con CPR previo al tratamiento neo-adyuvante, podría estar indicando que al momento del diagnóstico los pacientes con CPR tendrían un sistema inmunitario más activado, lo que podría favorecer una mejor respuesta al tratamiento.

Otro subtipo celular poco descrito que adquiere relevancia en la sangre periférica tras el tratamiento neo-adyuvante son las células T CD4 NKG2D<sup>+</sup>. En los pacientes con CPR tratados con quimio-inmunoterapia se detectaron niveles de expresión de NKG2D más elevados en las células T CD4. Este subtipo celular podría a su vez estar dividido en dos subtipos funcionalmente distintos mediante la expresión del co-activador CD28, implicados tanto en la regulación del sistema inmunitario como en una actividad citotóxica en el cáncer cervical (Garcia-Chagollan et al. 2015). También se ha asociado con la evolución de la enfermedad en CPCNP, ya que niveles elevados de CD4<sup>+</sup>NKG2D<sup>+</sup> se asociaron con estadios más avanzados (Yu et al. 2014).

En nuestro estudio, los niveles bajos de NKG2D en las células T CD4 en pacientes que no alcanzan respuestas completas post tratamiento neo-adyuvante podrían sugerir una función antitumoral de esta subpoblación. Pese a que las células T CD4<sup>+</sup> NKG2D<sup>+</sup> no son un subtipo ampliamente caracterizado en cáncer, estudios previos en enfermedades inflamatorias indican un papel proinflamatorio y citotóxico de estos linfocitos (Ruck et al. 2013; Babic et al. 2020), lo que podría explicar los niveles reducidos en pacientes con no-CPR.

Por otro lado, los pacientes con no-CPR podrían no expresar NKG2D o expresarlo en baja proporción como consecuencia del mecanismo de evasión de las células tumorales que inducen la internalización del receptor mediante la liberación al medio de los ligandos de NKG2D (NKG2DL) (Cascone et al. 2017). La reducción en la expresión de NKG2D en células T CD8 y células NK suele correlacionarse con un aumento de los niveles de MICA soluble (sMICA) en pacientes con cáncer cervical o de próstata como mecanismo de evasión (Arreygue-Garcia et al. 2008; Lundholm et al. 2014), además otros trabajos han demostrado el papel de los sNKG2DL en la tolerancia feto-materna en individuos sanos (Cox et al. 2015), lo que podría tener cierta similitud con la modulación por parte de las células epiteliales a los linfocitos citotóxicos para cesar su actividad.

Al realizar la medición de posibles mecanismos de evasión mediante factores solubles en plasma como SPD-L1 (Mazzaschi et al. 2020) o sNKG2DL no se observó asociación con la respuesta patológica. No obstante, sí se apreció un aumento significativo en la expresión de sMICA post tratamiento en el plasma de los pacientes con CPR, siendo esta acción contraria a la función característica de sMICA en la evasión tumoral, pero pudiendo reforzar resultados previos en cáncer cervical, en los que los niveles elevados de sMICA estaban asociados a una mayor supervivencia libre de enfermedad (Samuels et al. 2015). Una posible explicación a este fenómeno podría ser que sMICA no estuviera implicado directamente en el mecanismo de evasión tumoral en nuestro caso, sino que reflejara un mecanismo indirecto de tolerancia inmunitaria dirigido por las células epiteliales sanas (Moncayo et al. 2017). Otra hipótesis compatible con la anterior sería que ese aumento de sMICA se produjese en los pacientes con CPR por un mayor estrés que sufren sus células tumorales durante la neo-adyuvancia.

Aunque el tamaño muestral del estudio podría no ser el suficiente, estos resultados sugieren la importancia del eje NKG2D/NKG2DL en la regulación de la respuesta inmunitaria (Wensveen, Jelenčić y Polić 2018), por lo que futuros experimentos serían necesarios para valorar el efecto de sNKG2DL en pacientes con CPCNP.

### **Relevancia de la inmunidad innata: células NK y monocitos**

Cabe mencionar que en la presente tesis no se observaron diferencias significativas en la activación de las células NK en sangre periférica, caracterizadas por su expresión de CD56 y NKG2D, descritas previamente como posible marcador predictivo de buenos respondedores al tratamiento con nivolumab en estadios avanzados (Mazzaschi et al. 2019). Sin embargo, como se ha mencionado previamente, sí se pudo apreciar una mayor expresión de NKG2D en células T CD8 de pacientes con CPR en el momento del diagnóstico que podría ser indicativa de una respuesta inmunitaria adaptativa donde la inmunidad innata citotóxica no es tan relevante.

La expresión de PD-L1 por las células tumorales se utiliza como biomarcador predictivo en pacientes con CPCNP. Existe cierta controversia en el uso de este biomarcador ya que hay pacientes tratados con quimioterapia en combinación con inmunoterapia (Zinner et al. 2020; Shu et al. 2020) y tratados con inmunoterapia (Forde et al. 2018) que responden al tratamiento independiente de la expresión de PD-L1 en las células tumorales. Adicionalmente se ha descrito que niveles elevados de PD-L1 en los macrófagos está asociado a una mayor SG en pacientes con CPCNP tratados con anti-PD-1/PD-L1 (Liu et al. 2020). Contrariamente en nuestro trabajo no se detectaron diferencias significativas en el número de CD68<sup>+</sup>PD-L1<sup>+</sup> infiltrados en el tejido tumoral ni en el momento del diagnóstico ni post tratamiento neo-adyuvante. Estos resultados sugieren que existen otros mecanismos de evasión tumoral en estos pacientes más allá de la mediada por la expresión de PD-L1 en los macrófagos.

De manera similar a otros estudios se distinguió un mayor número de TAMs (CD68) en las muestras de tejido post tratamiento neo-adyuvante en los pacientes con CPR (Parra et al. 2018). Cabe mencionar que en los pacientes con IPR, aunque no de manera significativa, se pudieron percibir niveles más elevados de CD68<sup>+</sup> al diagnóstico. A pesar de que no se pudo definir si estos macrófagos presentaban una activación clásica (M1) o alternativa (M2) debido a los marcadores empleados en la tesis doctoral, se podría pensar que en los pacientes con IPR los macrófagos podrían estar participando en la inhibición de las respuestas antitumorales contribuyendo a la evasión del sistema inmunitario pre tratamiento y por tanto estos serían macrófagos M2. Por otro lado, en los pacientes que

alcanzan CPR podrían ser tanto macrófagos M2, cuya función sería controlar las potentes respuestas inmunitarias post tratamiento y reparar el daño tisular, como macrófagos M1 con función de fagocitosis (Hao et al. 2012).

Uno de los receptores involucrados en los mecanismos de evasión tumoral es CTLA-4, cuya función es la inhibición de las respuestas inmunitarias. Este receptor se expresa principalmente en células T pero recientemente se ha descrito en células NK y monocitos (Laurent et al. 2010; Davis-Marcisak et al. 2020). En nuestro estudio los pacientes con no-CPR presentaron al diagnóstico en sangre periférica niveles más elevados de CTLA-4 en células NK, T CD56<sup>+</sup> y en monocitos, lo que podría indicar una inhibición sobre todo de la respuesta innata mediante este receptor de forma independiente al eje PD-1/PD-L1, lo que resultaría en peores respuestas al tratamiento con nivolumab (anti-PD-1).

El análisis de los subtipos de los monocitos en sangre periférica sugiere que están participando en la respuesta inmunitaria en el momento del diagnóstico en los pacientes con CPR. Los monocitos con activación clásica o alternativa presentan porcentajes inferiores de células CTLA-4<sup>+</sup> en pacientes CPR pudiendo indicar una menor inhibición de los mismos al diagnóstico. Sin embargo, no se observaron niveles elevados de activación mediante CD69 en estas subpoblaciones de monocitos al diagnóstico en los pacientes con CPR, pero sí se detectaron niveles elevados de CD69 en monocitos intermedios. Adicionalmente, MCSF (Nemunaitis 1993) y PARC están implicados en la supervivencia de monocitos y macrófagos y son factores de mal pronóstico en cáncer de pulmón (Baghdadi et al. 2018; Plönes et al. 2012). No obstante, en nuestro estudio se determinaron niveles elevados de MCSF y PARC en aquellos pacientes con CPR, esto podría estar indicando la activación de los macrófagos, todavía presentes en el tejido tumoral post tratamiento, para la eliminación de las células muertas y la recuperación del tejido. Pero también podría ser el resultado del efecto de la quimioterapia, ya que terapias citotóxicas incrementan la expresión de MCSF en las células tumorales aumentando la infiltración de macrófagos (Nielsen y Schmid 2017). Por otro lado, cabe destacar que el rol de PARC en CPCNP sigue sin conocerse. Por lo tanto, el perfil de activación (bajo porcentaje de CTLA4<sup>+</sup> en monocitos clásicos y no clásicos, y alto de CD69<sup>+</sup> de los monocitos intermedios) al diagnóstico podría estar indicando una actividad antitumoral en el tejido a través de la diferenciación de los monocitos en macrófagos

infiltrantes tumorales que se observan elevados en el tejido post tratamiento neo-adyuvante de los pacientes CPR, como apoyaría además los niveles elevados de MCSF y PARC en los pacientes con CPR post tratamiento.

### **Relevancia de la inmunidad humoral: células B**

El principal biomarcador celular inmunitario asociado a respuesta patológica, una vez recibido el tratamiento neo-adyuvante, es el receptor CD19 en las células B. Este receptor caracteriza a las células B y juega un papel importante en la activación y proliferación de las mismas (Wang, Wei y Liu 2012). Adicionalmente, la presencia de células B previa al tratamiento con ICIs, en monoterapia o en combinación con quimioterapia, en pacientes con CPCNP estadio IV está asociado con una mayor SLP (Budczies et al. 2021). Asimismo, en los pacientes con CPR se pudo identificar presencia de células B aparentemente más grandes que denominamos CD19<sup>hi</sup>. Este tipo de células B podría indicar una población específica más activada con capacidad de liberación de inmunoglobulinas, ayudadas por las células T CD4 activadas (Liu et al. 2017); por tanto, en los pacientes con CPR se podría haber generado una respuesta inmunitaria humoral más efectiva frente al tumor.

En definitiva, la activación de las células B que se encontró en los pacientes con CPR post tratamiento (alta expresión de CD19, elevado porcentaje de CD19<sup>hi</sup> y niveles elevados de BCMA), podría estar asociada a un aumento de la respuesta humoral y por tanto podría indicar que estos pacientes habrían realizado una respuesta antitumoral efectiva a nivel sistémico. Por otro lado, a nivel local, también se observó la presencia de agregados linfoides en los tumores post tratamiento, compatibles con estructuras linfoides terciarias (Provencio et al. 2020). Nuestros resultados tanto a nivel sistémico como local, apoyados por otros trabajos en los que las estructuras linfoides terciarias suponen un factor de buen pronóstico en pacientes con CPCNP metastásicos tratados con inmunoterapia (Helmink et al. 2020), remarca la importancia de profundizar en el papel de las estructuras linfoides terciarias en futuros estudios en estadios tempranos de CPCNP.

## Neurotrofinas y presentación antigénica

En cuanto a los biomarcadores solubles analizados al diagnóstico en el plasma de los pacientes tratados con quimio-inmunoterapia neo-adyuvante, solo 3 se encontraron asociados a la respuesta patológica: se trata de b-NGF, NT-3 y VEGF-D, que podrían favorecer una mejor vascularización en el tumor, la angiogénesis, así como promover el crecimiento del tumor (Prakash et al. 2010; Ricci et al. 2001). Nuestros resultados mostraron que los pacientes que no eliminaron por completo el tumor presentaban niveles más altos de estas 3 citoquinas, sugiriendo que alteraciones en la angiogénesis podrían estar relacionadas con una peor respuesta al tratamiento de quimio-inmunoterapia.

Adicionalmente, estos pacientes con no-CPR presentaron niveles más elevados post tratamiento de MPIF-1 y Flt-3L. Aunque no hay muchos estudios describiendo la función de MPIF-1 o Flt-3L en cáncer, sí se conoce que MPIF-1, expresado en tejido pulmonar, inhibe la proliferación del progenitor mieloide y promueve la angiogénesis (Hwang et al. 2005) pudiendo contribuir a una menor respuesta antitumoral en los pacientes que no alcanzan respuestas completas. Sin embargo, Flt-3L podría ayudar a la presentación de antígenos por la célula tumoral y mejorar la supervivencia de los pacientes mediante el aumento de células dendríticas en el tejido (Shao et al. 2009). Los niveles elevados de Flt-3L en los pacientes con no-CPR post tratamiento podría indicar que el sistema inmunitario seguiría desarrollando una respuesta antitumoral para eliminar el tumor. Por lo tanto, niveles altos de estos factores solubles post tratamiento podrían indicar un pronóstico desfavorable en pacientes con CPCNP tratados con quimio-inmunoterapia.

Por otro lado, la mayoría de las citoquinas implicadas en respuestas antitumorales (interleuquinas o IFN- $\alpha$ ) se mantuvieron estables en los pacientes con CPR, mientras que los pacientes con no-CPR presentan una disminución estadísticamente significativa de las mismas. Esto podría indicar que en los pacientes con CPR, como se ha comentado con las células B y células T CD4, todavía se estaría manteniendo un sistema inmunitario moderadamente activado a nivel periférico, lo que podría sugerir que, aun cuando a nivel local el tumor se ha eliminado por completo, a nivel sistémico la respuesta inmunitaria todavía no habría cesado.

## Valor del estudio, limitaciones y futuras líneas de investigación

Pese a que está descrito el papel predictivo y pronóstico de los TILs en CPCNP (Wu et al. 2018; Mazzaschi et al. 2018; Oja et al. 2018; Uryvaev et al. 2018; Tuminello et al. 2019; Gu et al. 2019), en nuestro estudio debido a la limitación de muestras al diagnóstico válidas no pudimos determinar su papel, aunque sí se observaron algunas tendencias como el elevado número de células T memoria o linfocitos T PD-1<sup>+</sup> en los pacientes con CPR. Estos resultados fortalecen la importancia de avanzar en la búsqueda de biomarcadores predictivos en sangre periférica, debido a que el tejido puede ser difícil de obtener y solo refleja parcialmente la respuesta inmunitaria. El análisis de biopsias tumorales en bloques de parafina presenta una limitación destacable, ya que únicamente se selecciona una parte de la totalidad del tumor, por lo que la información extraída de estas muestras no es completa e incluso podría depender de la profundidad del corte.

En la presente tesis doctoral la mayoría de los marcadores en sangre encontrados al diagnóstico se pierden después del tratamiento neo-adyuvante con quimio-inmunoterapia. Generalmente se entiende la quimioterapia como un tratamiento inmunosupresor, pero en este trabajo se detectó que los porcentajes de las poblaciones inmunitarias se mantuvieron durante el tratamiento de manera similar a lo que ocurría en pacientes tratados con monoterapia anti-PD-1 (Kamphorst et al. 2017). Sin embargo, sí se observó una disminución generalizada de la mayoría de las subpoblaciones inmunitarias de monocitos, células T y células NK, excepto de las células T NKG2D<sup>+</sup>, las cuales aumentaban post tratamiento en los pacientes con CPR. Estos resultados podrían indicar una menor activación del sistema inmunitario con funciones citotóxicas, o un cese de la misma.

Globalmente nuestros resultados sugerirían que los pacientes con CPR podrían estar caracterizados por una respuesta inmunitaria generada de manera previa al tratamiento neo-adyuvante. Al diagnóstico se identificó en sangre periférica un reconocimiento antigénico (PD-1) y un perfil citotóxico (NKG2D y CD56), así como unos niveles bajos de citoquinas inhibitorias (neurotrofinas y VEGF-D) y receptores de inhibición (CTLA-4). Esta respuesta inmunitaria podría estar bloqueada por diferentes mecanismos como el eje PD-1/PD-L1 y por consiguiente cuando se trata a estos pacientes con anti-PD-1 se produce una eliminación completa del tumor. Adicionalmente, el tratamiento neo-adyuvante modificó



numerosas subpoblaciones de células inmunitarias, así como más de 50 citoquinas y factores solubles en plasma. En conjunto, nuestros resultados sugieren que los pacientes con CPR tendrían un comportamiento diferencial a nivel de células inmunitarias involucradas en la respuesta antitumoral.

Para finalizar, conviene destacar que este estudio presentó varias limitaciones entre las que se pueden encontrar: el reducido número de pacientes analizados en comparación con el número elevado de variables consideradas, la comparación de únicamente dos muestras de PBMCs (pre y post-tratamiento neo-adyuvante) que además fueron congeladas para su conservación pudiendo subestimar algunas diferencias en los marcadores, así como las posibles limitaciones de utilizar sangre periférica como indicador de respuesta inmunitaria antitumoral, ya que la visión del sistema inmunitario es sistémico y podría estar alterado por procesos infecciosos. Por último, la ausencia de un grupo de pacientes control tratados con quimioterapia o inmunoterapia neo-adyuvante limita la determinación de estos biomarcadores como factores predictivos. Aun así, estas limitaciones no invalidan los resultados de este trabajo, cuyo objetivo inicial es la búsqueda de posibles biomarcadores predictivos, pero sí refuerzan la necesidad de validar los biomarcadores descubiertos en cohortes de pacientes más grandes, así como definir el papel de estos en pacientes tratados solo con quimioterapia o con inmunoterapia.

A pesar de estas limitaciones, este es el primer estudio que identifica, al momento del diagnóstico, varios biomarcadores asociados al tipo de respuesta patológica en pacientes con CPCNP tratados con quimio-inmunoterapia neo-adyuvante en sangre periférica. Apoyando la utilidad de la sangre periférica como técnica no invasiva para caracterizar biomarcadores de respuesta que pudieran ser útiles para predecir CPR. Además, es el primer trabajo en describir los cambios producidos por el tratamiento con quimioterapia más nivolumab en estadios IIIA de pacientes con CPCNP en poblaciones inmunitarias tanto en tejido como en sangre periférica.

Profundizar en los mecanismos que subyacen en la respuesta inmunitaria y los receptores implicados en el reconocimiento antigénico tumoral, mediante experimentos *in vitro* o *in vivo*, podría favorecer el desarrollo de terapias celulares dirigidas. En la presente tesis, con los resultados obtenidos, una futura línea de investigación podría ser la realización de

estudios funcionales en modelos de ratón de los receptores PD-1, CTLA-4 y NKG2D en las células T CD56<sup>+</sup> y su función en la respuesta antitumoral debida a diferentes tratamientos. Otra futura línea de trabajo podría ser el papel de las células B en la formación de estructuras terciaras debido al tratamiento neo-adyuvante, así como la monitorización de las mismas en los largos supervivientes. Adicionalmente, el estudio de las neurotrofinas podría ser relevante para dilucidar el porqué de las elevadas tasas de respuesta patológica completa en pacientes con CPCNP tratados con quimio-inmunoterapia neo-adyuvante debido a su posible implicación en la formación de metástasis y angiogénesis.

Por último, el alto porcentaje de pacientes con CPR abre la posibilidad en el futuro de un cambio de paradigma en el tratamiento de estos pacientes con enfermedad localmente avanzada, en el que el valor de la cirugía en los algunos pacientes pudiera ser reducido. La identificación de biomarcadores predictivos de respuesta patológica completa en el momento del diagnóstico con alta especificidad y sensibilidad podrían informar de la no necesidad de la resección quirúrgica en aquellos pacientes que, debido al tratamiento neo-adyuvante, eliminaran por completo el tumor. Futuros ensayos clínicos deberán valorar la eficacia de la cirugía después del tratamiento con quimio-inmunoterapia neo-adyuvante en estadios iniciales del CPCNP.

# Capítulo 6

## Conclusiones

### 6 CONCLUSIONES

---

1. Los pacientes que son capaces de eliminar por completo el tumor presentan, en el momento del diagnóstico, un sistema inmunitario periférico con una mayor activación de las células citotóxicas y valores menores de neurotrofinas y factores angiogénicos.
2. Se han identificado doce biomarcadores inmunitarios asociados a la respuesta patológica completa en pacientes con cáncer de pulmón de célula no pequeña tratados con quimio-inmunoterapia neo-adyuvante.
3. El tratamiento neo-adyuvante produce una variación en las diferentes poblaciones celulares, en las subpoblaciones inmunitarias y en los niveles de factores solubles en plasma. Estas variaciones caracterizan de manera exclusiva a los pacientes con respuesta completa y respuesta no completa.
4. Después del tratamiento neo-adyuvante, los pacientes con respuesta patológica completa presentan cambios en relación al sistema inmunitario adaptativo, tanto en sangre periférica, con una mayor activación de células B; como en tejido tumoral, presentando un aumento de células T CD8 memoria y células T CD4 reguladoras.
5. El presente trabajo fundamenta la utilidad del análisis de la sangre periférica como fuente no invasiva para la identificación de biomarcadores inmunitarios que pueden

predecir la respuesta patológica de los pacientes con cáncer de pulmón de célula no pequeña.

6. La respuesta patológica parece ser un subrogado de la supervivencia en los pacientes con cáncer de pulmón de célula no pequeña estadio IIIA tratados con quimio-inmunoterapia neo-adyuvante.

# Capítulo 7

## Conclusions

### 7 CONCLUSIONS

---

1. Patients capable of eliminate completely the tumor presented at diagnosis an activated peripheral immune system with higher cytotoxic activity and lower levels of neurotrophins and angiogenic factors.
2. Twelve immune biomarkers associated with pathological response in non-small cells lung cancer patients treated with neoadjuvant chemo-immunotherapy were identified.
3. Neoadjuvant treatment produced a variation in different cell populations, in immune subpopulations and in soluble factors levels in plasma. These variations characterize exclusively complete pathological response and non-complete pathological response patients.
4. After neoadjuvant treatment, patients with complete pathological response experienced changes in their adaptive immune system in peripheral blood, with higher B cells activation; as well as in tumour tissue, with an increase in memory T CD8 cells and regulatory T cells.
5. This study grounds the utility of peripheral blood as a non-invasive source for identifying immune biomarkers that could predict pathological response in non-small cell lung cancer patients.

6. Pathological response seems to be a survival surrogate in stage IIIA non-small cell lung cancer patients treated with neoadjuvant chemo-immunotherapy.

# Capítulo 8

## Referencias

### 8 REFERENCIAS

---

ABUL K. ABBAS; ANDREW H. LICHTMAN AND SHIV PILLAI, 2018. *Cellular and Molecular Immunology*. 9th Editio. S.l.: Elsevier.

AIXA E. SOYANO, BHAGIRATHBHAI DHOLARIA, JULIAN A. MARIN-ACEVEDO, NANCY DIEHL, DAVID HODGE, YAN LUO, RAMI MANOCHAKIAN, SARANYA CHUMSRI, ALEX ADJEI, K.L.K. and Y. Lou, 2017. Peripheral blood biomarkers correlate with outcomes in advanced non-small cell lung Cancer patients treated with anti-PD-1 antibodies. *Journal of Thoracic Oncology*, vol. 12, no. 11, pp. S2011. ISSN 1556-1380.

ALDAROUISH, M., SU, X., QIAO, J., GAO, C., CHEN, Y., DAI, A., ZHANG, T., SHU, Y. y WANG, C., 2019. Immunomodulatory effects of chemotherapy on blood lymphocytes and survival of patients with advanced non-small cell lung cancer. *International Journal of Immunopathology and Pharmacology*, vol. 33. ISSN 20587384. DOI 10.1177/2058738419839592.

APOIL, P.A., PUISSANT-LUBRANO, B., CONGY-JOLIVET, N., PERES, M., TKACZUK, J., ROUBINET, F. y BLANCHER, A., 2017. Reference values for T, B and NK human lymphocyte subpopulations in adults. *Data in Brief*, vol. 12, pp. 400-404. ISSN 23523409. DOI 10.1016/j.dib.2017.04.019.

ARREYGUE-GARCIA, N.A., DANERI-NAVARRO, A., DEL TORO-ARREOLA, A., CID-ARREGUI, A., GONZALEZ-RAMELLA, O., JAVE-SUAREZ, L.F., AGUILAR-LEMARROY, A., TROYO-SANROMAN, R.,

BRAVO-CUELLAR, A., DELGADO-RIZO, V., GARCIA-IGLESIAS, T., HERNANDEZ-FLORES, G. y DEL TORO-ARREOLA, S., 2008. Augmented serum level of major histocompatibility complex class I-related chain A (MICA) protein and reduced NKG2D expression on NK and T cells in patients with cervical cancer and precursor lesions. *BMC Cancer*, vol. 8. ISSN 14712407. DOI 10.1186/1471-2407-8-16.

ARRIAGADA, R., DE RADIOMEDIC-INA, I., SANTIAGO, C., BERGMAN, B., DUNANT, A., LE CHEVALIER, T., PIGNON, J.-P. y VANSTEENKISTE, J., 2004. Cisplatin-Based Adjuvant Chemotherapy in Patients with Completely Resected Non-Small-Cell Lung Cancer. *New England Journal of Medicine*, vol. 350, no. 4, pp. 351-360. ISSN 0028-4793. DOI 10.1056/nejmoa031644.

BABIC, M., DIMITROPOULOS, C., HAMMER, Q., STEHLE, C., HEINRICH, F., SARSENBAYEVA, A., EISELE, A., DUREK, P., MASHREGHI, M.F., LISNIC, B., VAN SNICK, J., LÖHNING, M., FILLATREAU, S., WITHERS, D.R., GAGLIANI, N., HUBER, S., FLAVELL, R.A., POLIC, B. y ROMAGNANI, C., 2020. Nk cell receptor nkg2d enforces proinflammatory features and pathogenicity of th1 and th17 cells. *Journal of Experimental Medicine*, vol. 217, no. 8. ISSN 15409538. DOI 10.1084/jem.20190133.

BAECHER-ALLAN, C., BROWN, J.A., FREEMAN, G.J. y HAFLER, D.A., 2001. CD4 + CD25 high Regulatory Cells in Human Peripheral Blood . *The Journal of Immunology*, vol. 167, no. 3, pp. 1245-1253. ISSN 0022-1767. DOI 10.4049/jimmunol.167.3.1245.

BAGHDADI, M., ENDO, H., TAKANO, A., ISHIKAWA, K., KAMEDA, Y., WADA, H., MIYAGI, Y., YOKOSE, T., ITO, H., NAKAYAMA, H., DAIGO, Y., SUZUKI, N. y SEINO, K.I., 2018. High co-expression of IL-34 and M-CSF correlates with tumor progression and poor survival in lung cancers. *Scientific Reports*, vol. 8, no. 1, pp. 418. ISSN 20452322. DOI 10.1038/s41598-017-18796-8.

BENT, R., MOLL, L., GRABBE, S. y BROS, M., 2018. *Interleukin-1 beta—A friend or foe in malignancies?* 1 agosto 2018. S.l.: MDPI AG.

BERGHMANS, T., DURIEUX, V., HENDRIKS, L.E.L. y DINGEMANS, A.-M., 2020. Immunotherapy: From Advanced NSCLC to Early Stages, an Evolving Concept. *Frontiers in Medicine*, vol. 7, pp. 90. DOI 10.3389/fmed.2020.00090.

BERRAONDO, P., SANMAMED, M.F., OCHOA, M.C., ETXEBERRIA, I., AZNAR, M.A., PÉREZ-GRACIA, J.L., RODRÍGUEZ-RUIZ, M.E., PONZ-SARVISE, M., CASTAÑÓN, E. y MELERO, I., 2019. *Cytokines in clinical cancer immunotherapy*. 8 enero 2019. S.l.: Nature Publishing Group.



- BESSE, B., ADAM, J., COZIC, N., CHAPUT-GRAS, N., PLANCHARD, D., MEZQUITA, L., MASIP, J.R., LAVAUD, P., NALTET, C., GAZZAH, A., THOMAS DE MONTPREVILLE, V., GHIGNA, M.-R., MUSSOT, S., FADEL, E., MABILLE, L., DUCHEMANN, B., BARLESI, F., SORIA, J.-C., CARAMELLA, C. y MERCIER, O., 2020. 1215O - SC Neoadjuvant atezolizumab (A) for resectable non-small cell lung cancer (NSCLC): Results from the phase II PRINCEPS trial. *Annals of Oncology*, vol. 31, pp. S794-S795. ISSN 09237534. DOI 10.1016/j.annonc.2020.08.1417.
- BODOR, J.N., BOUMBER, Y. y BORGHAEI, H., 2020. *Biomarkers for immune checkpoint inhibition in non-small cell lung cancer (NSCLC)*. 15 enero 2020. S.l.: John Wiley and Sons Inc.
- BUDCZIES, J., KIRCHNER, M., KLUCK, K., KAZDAL, D., GLADE, J., ALLGÄUER, M., KRIEGSMANN, M., HEUSSEL, C.-P., HERTH, F.J., WINTER, H., MEISTER, M., MULEY, T., FRÖHLING, S., PETERS, S., SELIGER, B., SCHIRMACHER, P., THOMAS, M., CHRISTOPOULOS, P. y STENZINGER, A., 2021. A gene expression signature associated with B cells predicts benefit from immune checkpoint blockade in lung adenocarcinoma. *Onc Immunology*, vol. 10, no. 1, pp. 1860586. ISSN 2162402X. DOI 10.1080/2162402x.2020.1860586.
- CASCONI, R., CARLUCCI, A., PIERDILUCA, M., SANTINI, M. y FIORELLI, A., 2017. Prognostic value of soluble major histocompatibility complex class I polypeptiderelated sequence A in non-small-cell lung cancer - Significance and development. *Lung Cancer: Targets and Therapy*, vol. 8, pp. 161-167. ISSN 11792728. DOI 10.2147/LCTT.S105623.
- CASCONI, T., WILLIAM, W.N., WEISSFERDT, A., LEUNG, C.H., LIN, H.Y., PATAER, A., GODOY, M.C.B., CARTER, B.W., FEDERICO, L., REUBEN, A., KHAN, M.A.W., DEJIMA, H., FRANCISCO-CRUZ, A., PARRA, E.R., SOLIS, L.M., FUJIMOTO, J., TRAN, H.T., KALHOR, N., FOSSELLA, F. V., MOTT, F.E., TSAO, A.S., BLUMENSCHIN, G., LE, X., ZHANG, J., SKOULIDIS, F., KURIE, J.M., ALTAN, M., LU, C., GLISSON, B.S., BYERS, L.A., ELAMIN, Y.Y., MEHRAN, R.J., RICE, D.C., WALSH, G.L., HOFSTETTER, W.L., ROTH, J.A., ANTONOFF, M.B., KADARA, H., HAYMAKER, C., BERNATCHEZ, C., AJAMI, N.J., JENQ, R.R., SHARMA, P., ALLISON, J.P., FUTREAL, A., WARGO, J.A., WISTUBA, I.I., SWISHER, S.G., LEE, J.J., GIBBONS, D.L., VAPORCIYAN, A.A., HEYMACH, J. V. y SEPESI, B., 2021. Neoadjuvant nivolumab or nivolumab plus ipilimumab in operable non-small cell lung cancer: the phase 2 randomized NEOSTAR trial. *Nature Medicine*, ISSN 1078-8956. DOI 10.1038/s41591-020-01224-2.
- CHO, J.H., 2017. Immunotherapy for non-small-cell lung cancer: Current status and future obstacles. *Immune Network*, vol. 17, no. 6, pp. 378-391. ISSN 20926685. DOI 10.4110/in.2017.17.6.378.

- COX, J.D., 1990. A randomized phase I/II trial of hyperfractionated radiation therapy with total doses of 60.0 Gy to 79.2 Gy: Possible survival benefit with  $\geq 69.6$  Gy in favorable patients with radiation therapy oncology group stage III non-small-cell lung carcinoma: Report of radiation therapy oncology group 83-11. *Journal of Clinical Oncology*, vol. 8, no. 9, pp. 1543-1555. ISSN 0732183X. DOI 10.1200/JCO.1990.8.9.1543.
- COX, S.T., LAZA-BRIVIESCA, R., PEARSON, H., SORIA, B., GIBSON, D., GOMEZ, S., MADRIGAL, J.A. y SAUDEMONT, A., 2015. Umbilical cord blood plasma contains soluble NKG2D ligands that mediate loss of natural killer cell function and cytotoxicity. *European Journal of Immunology*, vol. 45, no. 8, pp. 2324-2334. ISSN 15214141. DOI 10.1002/eji.201444990.
- CÓZAR, B., GREPPI, M., CARPENTIER, S., NARNI-MANCINELLI, E., CHIOSSONE, L. y VIVIER, E., 2021. Tumor-Infiltrating Natural Killer Cells. , no. January. DOI 10.1158/2159-8290.CD-20-0655.
- CRINÒ, L., WEDER, W., VAN MEERBEECK, J. y FELIP, E., 2010. Early stage and locally advanced (non-metastatic) non-small-cell lung cancer: ESMO clinical practice guidelines for diagnosis, treatment and follow-up. *Annals of Oncology*, vol. 21, no. SUPPL. 5. ISSN 09237534. DOI 10.1093/annonc/mdq207.
- DAVIS-MARCISAK, E.F., FITZGERALD, A.A., KESSLER, M.D., DANILOVA, L., JAFFEE, E.M., ZAIDI, N., WEINER, L.M. y FERTIG, E.J., 2020. A novel mechanism of natural killer cell response to anti-CTLA-4 therapy identified by integrative analysis of mouse and human tumors. *bioRxiv*, pp. 2020.05.31.125625. DOI 10.1101/2020.05.31.125625.
- DETTERBECK, F.C., 2018. *The eighth edition TNM stage classification for lung cancer: What does it mean on main street?* 1 enero 2018. S.l.: Mosby Inc.
- DIEM, S., SCHMID, S., KRAPF, M., FLATZ, L., BORN, D., JOCHUM, W., TEMPLETON, A.J. y FRÜH, M., 2017. Neutrophil-to-Lymphocyte ratio (NLR) and Platelet-to-Lymphocyte ratio (PLR) as prognostic markers in patients with non-small cell lung cancer (NSCLC) treated with nivolumab. *Lung Cancer*, vol. 111, pp. 176-181. ISSN 18728332. DOI 10.1016/j.lungcan.2017.07.024.
- DRAKE, C.G., JAFFEE, E. y PARDOLL, D.M., 2006. Mechanisms of Immune Evasion by Tumors. *Advances in Immunology*, vol. 90, no. 1, pp. 51-81. ISSN 00652776. DOI 10.1016/S0065-2776(06)90002-9.
- DUAN, M.C., HAN, W., JIN, P.W., WEI, Y.P., WEI, Q., ZHANG, L.M. y LI, J.C., 2015. Disturbed Th17/Treg Balance in Patients with Non-small Cell Lung Cancer. *Inflammation*, vol. 38, no. 6, pp. 2156-2165.

ISSN 15732576. DOI 10.1007/s10753-015-0198-x.

DUNN, G.P., OLD, L.J. y SCHREIBER, R.D., 2004. *The immunobiology of cancer immunosurveillance and immunoediting*. 1 agosto 2004. S.l.: Elsevier.

EL-SHERIEF, A.H., LAU, C.T., WU, C.C., DRAKE, R.L., ABBOTT, G.F. y RICE, T.W., 2014. International Association for the Study of Lung Cancer (IASLC) lymph node map: Radiologic review with CT illustration. *Radiographics*, vol. 34, no. 6, pp. 1680-1691. ISSN 15271323. DOI 10.1148/rg.346130097.

FACCHINETTI, F., VENEZIANI, M., BUTI, S., GELSOMINO, F., SQUADRILLI, A., BORDI, P., BERSANELLI, M., COSENZA, A., FERRI, L., RAPACCHI, E., MAZZASCHI, G., LEONARDI, F., QUAINI, F., ARDIZZONI, A., MISSALE, G. y TISEO, M., 2018. Clinical and hematologic parameters address the outcomes of non-small-cell lung cancer patients treated with nivolumab. *Immunotherapy*, vol. 10, no. 8, pp. 681-694. ISSN 17507448. DOI 10.2217/imt-2017-0175.

FESTINO, L., BOTTI, G., LORIGAN, P., MASUCCI, G. V., HIPPE, J.D., HORAK, C.E., MELERO, I. y ASCIERTO, P.A., 2016. *Cancer Treatment with Anti-PD-1/PD-L1 Agents: Is PD-L1 Expression a Biomarker for Patient Selection?* 2016. S.l.: s.n.

FORDE, P.M., CHAFT, J.E., SMITH, K.N., ANAGNOSTOU, V., COTTRELL, T.R., HELLMANN, M.D., ZAHURAK, M., BRODERICK, S., YANG, S.C., JONES, D.R., BATTAFARANO, R.J., VELEZ, M.J., REKHTMAN, N., OLAH, Z., VERDE, F., NAIDOO, J., MARRONE, K.A., GUO, H., SIDHOM, J.W., ZHANG, J., CAUSHI, J.X., CHAN, H.Y., SCHARPF, R.B., WHITE, J., GABRIELSON, E., WANG, H., ROSNER, G.L., RUSCH, V., WOLCHOK, J.D., MERGHOUB, T., TAUBE, J.M., VELCULESCU, V.E., TOPALIAN, S.L., BRAHMER, J.R. y PARDOLL, D.M., 2018. Neoadjuvant PD-1 blockade in resectable lung cancer. *New England Journal of Medicine*, vol. 378, no. 21, pp. 1976-1986. ISSN 15334406. DOI 10.1056/NEJMoa1716078.

FRIDMAN, W.H., PAGÈS, F., SAUTS-FRIDMAN, C. y GALON, J., 2012. The immune contexture in human tumours: Impact on clinical outcome. *Nature Reviews Cancer*, vol. 12, no. 4, pp. 298-306. ISSN 1474175X. DOI 10.1038/nrc3245.

GALON, J., COSTES, A., SANCHEZ-CABO, F., KIRILOVSKY, A., MLECNIK, B., LAGORCE-PAGÈS, C., TOSOLINI, M., CAMUS, M., BERGER, A., WIND, P., ZINZINDOHOUE, F., BRUNEVAL, P., CUGNENC, P.H., TRAJANOSKI, Z., FRIDMAN, W.H. y PAGÈS, F., 2006. Type, density, and location of immune cells within human colorectal tumors predict clinical outcome. *Science*, vol. 313, no. 5795, pp.

1960-1964. ISSN 00368075. DOI 10.1126/science.1129139.

GARCIA-CHAGOLLAN, M., FELIPE JAVE-SUAREZ, L., HARAMATI, J., RUTH BUENO-TOPETE, M., AGUILAR-LEMARROY, A., ESTRADA-CHAVEZ, C., ESTELA BASTIDAS-RAMIREZ, B., LAURA PEREIRA-SUAREZ, A. y DEL TORO-ARREOLA, S., 2015. An approach to the immunophenotypic features of circulating CD4 + NKG2D + T cells in invasive cervical carcinoma. , DOI 10.1186/s12929-015-0190-7.

GARCIA, S., DISANTO, J. y STOCKINGER, B., 1999. Following the development of a CD4 T cell response in vivo: From activation to memory formation. *Immunity*, vol. 11, no. 2, pp. 163-171. ISSN 10747613. DOI 10.1016/S1074-7613(00)80091-6.

GAUDREAU, P.O., NEGRAO, M. V., MITCHELL, K.G., REUBEN, A., CORSINI, E.M., LI, J., KARPINETS, T. V., WANG, Q., DIAO, L., WANG, J., FEDERICO, L., PARRA-CUENTAS, E.R., KHAIRULLAH, R., BEHRENS, C., CORREA, A.M., GOMEZ, D., LITTLE, L., GUMBS, C., KADARA, H.N., FUJIMOTO, J., MCGRIL, D.J., VAPORCIYAN, A.A., SWISHER, S.G., WALSH, G., ANTONOFF, M.B., WEISSFERDT, A., TRAN, H., ROARTY, E., HAYMAKER, C., BERNATCHEZ, C., ZHANG, Jianhua, FUTREAL, P.A., WISTUBA, I.I., CASCONI, T., HEYMACH, J. V., SEPESI, B., ZHANG, Jianjun y GIBBONS, D.L., 2020. Neoadjuvant Chemotherapy Increases Cytotoxic T Cell, Tissue Resident Memory T Cell, and B Cell Infiltration in Resectable NSCLC. *Journal of Thoracic Oncology*, vol. 16, no. 1, pp. 127-139. ISSN 15561380. DOI 10.1016/j.jtho.2020.09.027.

GE, W., LI, J., FAN, W., XU, D. y SUN, S., 2017. Tim-3 as a diagnostic and prognostic biomarker of osteosarcoma. *Tumor Biology*, vol. 39, no. 7, pp. 1-8. ISSN 14230380. DOI 10.1177/1010428317715643.

GHARAGOZLOO, M., KALANTARI, H., REZAEI, A., MARACY, M.R., SALEHI, M., BAHADOR, A., HASSANNEJAD, N., NARIMANI, M., SANEI, M.H., BAYAT, B. y GHAZANFARI, H., 2015. The decrease in NKG2D+ Natural Killer cells in peripheral blood of patients with metastatic colorectal cancer. *Bratislava Medical Journal*, vol. 116, no. 5, pp. 296-301. ISSN 13360345. DOI 10.4149/BLL\_2015\_056.

GILLARD-BOCQUET, M., CAER, C., CAGNARD, N., CROZET, L., PEREZ, M., FRIDMAN, W.H., SAUTÉS-FRIDMAN, C. y CREMER, I., 2013. Lung tumor microenvironment induces specific gene expression signature in intratumoral NK cells. *Frontiers in Immunology*, vol. 4, no. FRB. ISSN 16643224. DOI 10.3389/fimmu.2013.00019.

GOLDSTRAW, P., CHANSKY, K., CROWLEY, J., RAMI-PORTA, R., ASAMURA, H., EBERHARDT, W.E.E.,

NICHOLSON, A.G., GROOME, P., MITCHELL, A., BOLEJACK, V., BALL, D., BEER, D.G., BEYRUTI, R., DETTERBECK, F., EDWARDS, J., GALATEAU-SALLÉ, F., GIROUX, D., GLEESON, F., HUANG, J., KENNEDY, C., KIM, J., KIM, Y.T., KINGSBURY, L., KONDO, H., KRASNIK, M., KUBOTA, K., LERUT, A., LYONS, G., MARINO, M., MAROM, E.M., VAN MEERBEECK, J., NAKANO, T., NOWAK, A., PEAKE, M., RICE, T., ROSENZWEIG, K., RUFFINI, E., RUSCH, V., SAIJO, N., VAN SCHIL, P., SCULIER, J.P., SHEMANSKI, L., STRATTON, K., SUZUKI, K., TACHIMORI, Y., THOMAS, C.F., TRAVIS, W., TSAO, M.S., TURRISI, A., VANSTEENKISTE, J., WATANABE, H., WU, Yi Long, BAAS, P., ERASMUS, J., HASEGAWA, S., INAI, K., KERNSTINE, K., KINDLER, H., KRUG, L., NACKAERTS, K., PASS, H., RICE, D., FALKSON, C., FILOSSO, P.L., GIACCONE, G., KONDO, K., LUCCHI, M., OKUMURA, M., BLACKSTONE, E., ABAD CAVACO, F., ANSÓTEGUI BARRERA, E., ABAL ARCA, J., PARENTE LAMELAS, I., ARNAU OBRER, A., GUIJARRO JORGE, R., BASCOM, G.K., BLANCO OROZCO, A.I., GONZÁLEZ CASTRO, M., BLUM, M.G., CHIMONDEGUY, D., CVIJANOVIC, V., DEFRANCHI, S., DE OLAIZ NAVARRO, B., ESCOBAR CAMPUZANO, I., MACÍA VIDUEIRA, I., FERNÁNDEZ ARAUJO, E., ANDREO GARCÍA, F., FONG, K.M., FRANCISCO CORRAL, G., CEREZO GONZÁLEZ, S., FREIXINET GILART, J., GARCÍA ARANGÜENA, L., GARCÍA BARAJAS, S., GIRARD, P., GOKSEL, T., GONZÁLEZ BUDIÑO, M.T., GONZÁLEZ CASAURRÁN, G., GULLÓN BLANCO, J.A., HERNÁNDEZ HERNÁNDEZ, J., HERNÁNDEZ RODRÍGUEZ, H., HERRERO COLLANTES, J., IGLESIAS HERAS, M., IZQUIERDO ELENA, J.M., JAKOBSEN, E., KOSTAS, S., LEÓN ATANCE, P., NÚÑEZ ARES, A., LIAO, M., LOSANOVSKY, M., MAGAROLAS, R., DE ESTEBAN JÚLVEZ, L., MARIÑÁN GOROSPE, M., MCCAUGHAN, B., MELCHOR ÍÑIGUEZ, R., MIRAVET SORRIBES, L., NARANJO GOZALO, S., ÁLVAREZ DE ARRIBA, C., NÚÑEZ DELGADO, M., PADILLA ALARCÓN, J., PEÑALVER CUESTA, J.C., PARK, J.S., PAVÓN FERNÁNDEZ, M.J., ROSENBERG, M., SÁNCHEZ DE COS ESCUÍN, J.S., SAURA VINUESA, A., STRAND, T.E., SERRA MITJANS, M., SUBOTIC, D., SWISHER, S., TERRA, R., THOMAS, C., TOURNOY, K., VELASQUEZ, M., WU, Y. L. y YOKOI, K., 2016. The IASLC lung cancer staging project: Proposals for revision of the TNM stage groupings in the forthcoming (eighth) edition of the TNM Classification for lung cancer. *Journal of Thoracic Oncology*, vol. 11, no. 1, pp. 39-51. ISSN 15561380. DOI 10.1016/j.jtho.2015.09.009.

GOODS, B.A., HERNANDEZ, A.L., LOWTHER, D.E., LUCCA, L.E., LERNER, B.A., GUNEL, M., RADDASSI, K., CORIC, V., HAFLER, D.A. y LOVE, J.C., 2017. Functional differences between PD-1+ and PD-1-CD4+ effector T cells in healthy donors and patients with glioblastoma multiforme. *PLoS ONE*, vol. 12, no. 9. ISSN 19326203. DOI 10.1371/journal.pone.0181538.

GORDON, S.R., MAUTE, R.L., DULKEN, B.W., HUTTER, G., GEORGE, B.M., MCCracken, M.N., GUPTA, R., TSAI, J.M., SINHA, R., COREY, D., RING, A.M., CONNOLLY, A.J. y WEISSMAN, I.L., 2017. PD-1 expression by tumour-associated macrophages inhibits phagocytosis and tumour immunity.

*Nature*, vol. 545, no. 7655, pp. 495-499. ISSN 14764687. DOI 10.1038/nature22396.

GROH, V., WU, J., YEE, C. y SPIES, T., 2002. Tumour-derived soluble MIC ligands impair expression of NKG2D and T-cell activation. *Nature*, vol. 419, no. 6908, pp. 734-738. ISSN 00280836. DOI 10.1038/nature01112.

GU, Y., SHENG, S.Y., TANG, Y.Y., LU, C.G., ZOU, J.Y., WANG, Y.F. y HONG, H., 2019. PD-1 Expression and Function of T-Cell Subsets in TILs from Human Lung Cancer. *Journal of Immunotherapy*, vol. 42, no. 8, pp. 297-308. ISSN 15374513. DOI 10.1097/CJI.0000000000000292.

HAKANEN, H., HERNBERG, M., MÄKELÄ, S., YADAV, B., BRÜCK, O., JUTEAU, S., KOHTAMÄKI, L., ILANDER, M., MUSTJOKI, S. y KREUTZMAN, A., 2018. Anti-PD1 therapy increases peripheral blood NKT cells and chemokines in metastatic melanoma patients. *Annals of Oncology*, vol. 29, pp. x3. ISSN 0923-7534. DOI 10.1093/annonc/mdy493.007.

HANAHAN, D. y COUSSENS, L.M., 2012. *Accessories to the Crime: Functions of Cells Recruited to the Tumor Microenvironment*. 20 marzo 2012. S.l.: Cell Press.

HANAHAN, D. y WEINBERG, R.A., 2011. *Hallmarks of cancer: The next generation*. 4 marzo 2011. S.l.: Elsevier.

HAO, N.B., LÜ, M.H., FAN, Y.H., CAO, Y.L., ZHANG, Z.R. y YANG, S.M., 2012. *Macrophages in tumor microenvironments and the progression of tumors*. 2012. S.l.: s.n.

HELLMANN, M.D., CHAFT, J.E., WILLIAM, W.N., RUSCH, V., PISTERS, K.M.W., KALHOR, N., PATAER, A., TRAVIS, W.D., SWISHER, S.G. y KRIS, M.G., 2014. *Pathological response after neoadjuvant chemotherapy in resectable non-small-cell lung cancers: Proposal for the use of major pathological response as a surrogate endpoint*. enero 2014. S.l.: NIH Public Access.

HELMINK, B.A., REDDY, S.M., GAO, J., ZHANG, S., BASAR, R., THAKUR, R., YIZHAK, K., SADE-FELDMAN, M., BLANDO, J., HAN, G., GOPALAKRISHNAN, V., XI, Y., ZHAO, H., AMARIA, R.N., TAWBI, H.A., COGDILL, A.P., LIU, W., LEBLEU, V.S., KUGERATSKI, F.G., PATEL, S., DAVIES, M.A., HWU, P., LEE, J.E., GERSHENWALD, J.E., LUCCI, A., ARORA, R., WOODMAN, S., KEUNG, E.Z., GAUDREAU, P.-O., REUBEN, A., SPENCER, C.N., BURTON, E.M., HAYDU, L.E., LAZAR, A.J., ZAPASSODI, R., HUDGENS, C.W., LEDESMA, D.A., ONG, S., BAILEY, M., WARREN, S., RAO, D., KRIJGSMAN, O., ROZEMAN, E.A., PEEPER, D., BLANK, C.U., SCHUMACHER, T.N., BUTTERFIELD, L.H., ZELAZOWSKA, M.A., MCBRIDE, K.M., KALLURI, R., ALLISON, J., PETITPREZ, F., FRIDMAN, W.H., SAUTÈS-FRIDMAN, C., HACOEN,

- N., REZVANI, K., SHARMA, P., TETZLAFF, M.T., WANG, L. y WARGO, J.A., 2020. B cells and tertiary lymphoid structures promote immunotherapy response. *Nature*, vol. 577, no. 7791, pp. 549-555. ISSN 0028-0836. DOI 10.1038/s41586-019-1922-8.
- HOFMAN, P., 2020. New insights into the interaction of the immune system with non-small cell lung carcinomas. *Translational Lung Cancer Research*, vol. 9, no. 5, pp. 2199-2213. ISSN 22186751. DOI 10.21037/tlcr-20-178.
- HU, X., GU, Y., ZHAO, S., HUA, S. y JIANG, Y., 2019. Elevated Circulating CD4+CD25-Foxp3+ Regulatory T Cells in Patients with Nonsmall Cell Lung Cancer. *Cancer Biotherapy and Radiopharmaceuticals*, vol. 34, no. 5, pp. 325-333. ISSN 15578852. DOI 10.1089/cbr.2018.2672.
- HURKMANS, D.P., BASAK, E.A., SCHEPERS, N., OOMEN-DE HOOP, E., VAN DER LEEST, C.H., EL BOUAZZAOU, S., BINS, S., KOOLEN, S.L.W., SLEIJFER, S., VAN DER VELDT, A.A.M., DEBETS, R., VAN SCHAIK, R.H.N., AERTS, J.G.J.V. y MATHIJSEN, R.H.J., 2020. Granzyme B is correlated with clinical outcome after PD-1 blockade in patients with stage IV non-small-cell lung cancer. *Journal for ImmunoTherapy of Cancer*, vol. 8, no. 1. ISSN 20511426. DOI 10.1136/jitc-2020-000586.
- HWANG, J., SON, K.N., CHAN, W.K., KO, J., DOE, S.N., KWON, B.S., YONG, S.G. y KIM, J., 2005. Human CC chemokine CCL23, a ligand for CCR1, induces endothelial cell migration and promotes angiogenesis. *Cytokine*, vol. 30, no. 5, pp. 254-263. ISSN 10434666. DOI 10.1016/j.cyto.2005.01.018.
- INOMATA, M., HIRAI, T., SETO, Z., TOKUI, K., TAKA, C., OKAZAWA, S., KAMBARA, K., ICHIKAWA, T., IMANISHI, S., YAMADA, T., MIWA, T., HAYASHI, R. y TOBE, K., 2020. Clinical Parameters for Predicting the Survival in Patients with Squamous and Non-squamous-cell NSCLC Receiving PD-1 Inhibitor Therapy. *Pathology and Oncology Research*, vol. 26, no. 1, pp. 327-333. ISSN 15322807. DOI 10.1007/s12253-018-0473-x.
- INOMATA, M., KADO, T., OKAZAWA, S., IMANISHI, S., TAKA, C., KAMBARA, K., HIRAI, T., TANAKA, H., TOKUI, K., HAYASHI, K., MIWA, T., HAYASHI, R., MATSUI, S. y TOBE, K., 2019. Peripheral PD1-positive CD4 T-lymphocyte count can predict progression-free survival in patients with non-small cell lung cancer receiving immune checkpoint inhibitor. *Anticancer Research*, vol. 39, no. 12, pp. 6887-6893. ISSN 17917530. DOI 10.21873/anticancer.13908.
- INSTITUTO NACIONAL DEL CÁNCER, 2021a. Definición de inhibidor de puntos de control inmunitario - Diccionario de cáncer -. [en línea]. [Consulta: 12 enero 2021]. Disponible en:

<https://www.cancer.gov/espanol/publicaciones/diccionario/def/inhibidor-de-puntos-de-control-inmunitario>.

INSTITUTO NACIONAL DEL CÁNCER, 2021b. Tratamiento del cáncer de pulmón de células no pequeñas – Versión para profesionales de salud. [en línea]. [Consulta: 5 febrero 2021]. Disponible en: <https://www.cancer.gov/espanol/tipos/pulmon/pro/tratamiento-pulmon-celulas-no-pequenas-pdq>.

ISHIDA, Y., AGATA, Y., SHIBAHARA, K. y HONJO, T., 1992. Induced expression of PD-1, a novel member of the immunoglobulin gene superfamily, upon programmed cell death. *EMBO Journal*, vol. 11, no. 11, pp. 3887-3895. ISSN 02614189. DOI 10.1002/j.1460-2075.1992.tb05481.x.

KAMPHORST, A.O., PILLAI, R.N., YANG, S., NASTI, T.H., AKONDY, R.S., WIELAND, A., SICA, G.L., YU, K., KOENIG, L., PATEL, N.T., BEHERA, M., WU, H., MCCAUSLAND, M., CHEN, Z., ZHANG, C., KHURI, F.R., OWONIKOKO, T.K., AHMED, R. y RAMALINGAM, S.S., 2017. Proliferation of PD-1+ CD8 T cells in peripheral blood after PD-1-targeted therapy in lung cancer patients. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, vol. 114, no. 19, pp. 4993-4998. ISSN 10916490. DOI 10.1073/pnas.1705327114.

KIM, J.M. y CHEN, D.S., 2016. Immune-escape to PD-L1/PD-1 blockade: 7 steps to success (or failure). *Ann. Oncol.*, pp. 1-13. ISSN 0923-7534. DOI 10.1093/annonc/mdw217.

KIM, K.H., CHO, J., KU, B.M., KOH, J., SUN, J.M., LEE, S.H., AHN, J.S., CHEON, J., MIN, Y.J., PARK, S.H., PARK, K., AHN, M.J. y SHIN, E.C., 2019. The first-week proliferative response of peripheral blood PD-1<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup> T cells predicts the response to Anti-PD-1 therapy in solid tumors. *Clinical Cancer Research*, vol. 25, no. 7, pp. 2144-2154. ISSN 15573265. DOI 10.1158/1078-0432.CCR-18-1449.

KIM, K.H., KIM, C.G. y SHIN, E.C., 2020. Peripheral blood immune cell-based biomarkers in anti-PD-1/PD-L1 therapy. *Immune Network*, vol. 20, no. 1, pp. 1-15. ISSN 20926685. DOI 10.4110/in.2020.20.e8.

KIRN DH, LYNCH TJ, MENTXER SJ, LEE TH, STRAUSS GM, E.A. et al., 1994. Multimodality therapy of patients with stage IIIA, N2 non- small-cell lung cancer: Impact of preoperative chemotherapy on resectability and downstaging. , vol. 2, no. 1995, pp. 1995.

KOH, J., HUR, J.Y., LEE, K.Y., KIM, M.S., HEO, J.Y., KU, B.M., SUN, J.M., LEE, S.H., AHN, J.S., PARK, K. y AHN, M.J., 2020. Regulatory (FoxP3+) T cells and TGF- $\beta$  predict the response to anti-PD-1



- immunotherapy in patients with non-small cell lung cancer. *Scientific Reports*, vol. 10, no. 1, pp. 1-10. ISSN 20452322. DOI 10.1038/s41598-020-76130-1.
- KRIJGSMAN, D., HOKLAND, M. y KUPPEN, P.J.K., 2018. *The role of natural killer T cells in cancer-A phenotypical and functional approach*. 27 febrero 2018. S.l.: Frontiers Media S.A.
- KWIATKOWSKI, D.J., RUSCH, V.W., CHAFT, J.E., JOHNSON, B.E., NICHOLAS, A., WISTUBA, I.I., MERRITT, R., LEE, J.M., BUNN, P.A., TANG, Y., PHAN, S.-C., WAQAR, S.N., PATTERSON, A., HAURA, E.B., TOLOZA, E.M., RECKAMP, K.L., RAZ, D., SCHULZE, K., JOHNSON, A. y CARBONE, D.P., 2019. Neoadjuvant atezolizumab in resectable non-small cell lung cancer (NSCLC): Interim analysis and biomarker data from a multicenter study (LCMC3). *Journal of Clinical Oncology*, vol. 37, no. 15\_suppl, pp. 8503-8503. ISSN 0732-183X. DOI 10.1200/jco.2019.37.15\_suppl.8503.
- L RAPOPORT, B., THERON, A.J., VOROBIOF, D.A., LANGENHOVEN, L., HALL, J.M., VAN EEDEN, R.I., SMIT, T., CHAN, S.-W., BOTHA, M.C., RAATS, J.I., NECKER, M. De y ANDERSON, R., 2020. Prognostic significance of the neutrophil/lymphocyte ratio in patients undergoing treatment with nivolumab for recurrent non-small-cell lung cancer. *Lung Cancer Management*, vol. 9, no. 3, pp. LMT37. ISSN 1758-1966. DOI 10.2217/lmt-2020-0014.
- LAURENT, S., CARREGA, P., SAVERINO, D., PICCIOLI, P., CAMORIANO, M., MORABITO, A., DOZIN, B., FONTANA, V., SIMONE, R., MORTARA, L., MINGARI, M.C., FERLAZZO, G. y PISTILLO, M.P., 2010. CTLA-4 is expressed by human monocyte-derived dendritic cells and regulates their functions. , DOI 10.1016/j.humimm.2010.07.007.
- LIU, J., BLAKE, S.J., YONG, M.C.R., HARJUNPÄÄ, H., NGIOW, S.F., TAKEDA, K., YOUNG, A., O'DONNELL, J.S., ALLEN, S., SMYTH, M.J. y TENG, M.W.L., 2016. Improved efficacy of neoadjuvant compared to adjuvant immunotherapy to eradicate metastatic disease. *Cancer Discovery*, vol. 6, no. 12, pp. 1382-1399. ISSN 21598290. DOI 10.1158/2159-8290.CD-16-0577.
- LIU, Y., ZUGAZAGOITIA, J., AHMED, F.S., HENICK, B.S., GETTINGER, S.N., HERBST, R.S., SCHALPER, K.A. y RIMM, D.L., 2020. Immune cell PD-L1 colocalizes with macrophages and is associated with outcome in PD-1 pathway blockade therapy. *Clinical Cancer Research*, vol. 26, no. 4, pp. 970-977. ISSN 15573265. DOI 10.1158/1078-0432.CCR-19-1040.
- LIU, Z., ZENG, W., HUANG, X., WANG, S., ZHENG, J., PAN, M. y WANG, Y., 2017. Peripheral CD19hi B cells exhibit activated phenotype and functionality in promoting IgG and IgM production in human autoimmune diseases. *Scientific Reports*, vol. 7, no. 1. ISSN 20452322. DOI

10.1038/s41598-017-14089-2.

LORENZO-GONZALEZ, M., RUANO-RAVINA, A., TORRES-DURAN, M., KELSEY, K.T., PROVENCIO, M., PARENTE-LAMELAS, I., PIÑEIRO-LAMAS, M., VARELA-LEMA, L., PEREZ-RIOS, M., FERNANDEZ-VILLAR, A. y BARROS-DIOS, J.M., 2020. Lung cancer risk and residential radon exposure: A pooling of case-control studies in northwestern Spain. *Environmental Research*, vol. 189. ISSN 10960953. DOI 10.1016/j.envres.2020.109968.

LOU, Y., DIAO, L., CUENTAS, E.R.P., DENNING, W.L., CHEN, L., FAN, Y.H., BYERS, L.A., WANG, J., PAPADIMITRAKOPOULOU, V.A., BEHRENS, C., RODRIGUEZ, J.C., HWU, P., WISTUBA, I.I., HEYMACH, J. V y GIBBONS, D.L., 2016. Epithelial-Mesenchymal Transition Is Associated with a Distinct Tumor Microenvironment Including Elevation of Inflammatory Signals and Multiple Immune Checkpoints in Lung Adenocarcinoma. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research*, vol. 22, no. 14, pp. 3630-42. ISSN 1078-0432. DOI 10.1158/1078-0432.CCR-15-1434.

LUNDHOLM, M., SCHRÖDER, M., NAGAEVA, O., BARANOV, V., WIDMARK, A., MINCHEVA-NILSSON, L. y WIKSTRÖM, P., 2014. Prostate Tumor-Derived Exosomes Down-Regulate NKG2D Expression on Natural Killer Cells and CD8+ T Cells: Mechanism of Immune Evasion. En: P. BUSSON (ed.), *PLoS ONE*, vol. 9, no. 9, pp. e108925. ISSN 1932-6203. DOI 10.1371/journal.pone.0108925.

LUU, K., SHAO, Z. y SCHWARZ, H., 2020. The relevance of soluble CD137 in the regulation of immune responses and for immunotherapeutic intervention. *Journal of Leukocyte Biology*, no. November 2019, pp. 1-8. ISSN 19383673. DOI 10.1002/JLB.2MR1119-224R.

MAJEM, M., JUAN, O., INSA, A., REGUART, N., TRIGO, J.M., CARCERENY, E., GARCÍA-CAMPELO, R., GARCÍA, Y., GUIRADO, M. y PROVENCIO, M., 2019. SEOM clinical guidelines for the treatment of non-small cell lung cancer (2018). *Clinical and Translational Oncology*, vol. 21, no. 1, pp. 3-17. ISSN 16993055. DOI 10.1007/s12094-018-1978-1.

MARTENS, A., WISTUBA-HAMPRECHT, K., FOPPEN, M.G., YUAN, J., POSTOW, M.A., WONG, P., ROMANO, E., KHAMMARI, A., DRENO, B., CAPONE, M., ASCIERTO, P.A., DI GIACOMO, A.M., MAIO, M., SCHILLING, B., SUCKER, A., SCHADENDORF, D., HASSEL, J.C., EIGENTLER, T.K., MARTUS, P., WOLCHOK, J.D., BLANK, C., PAWELEC, G., GARBE, C. y WEIDE, B., 2016. Baseline peripheral blood biomarkers associated with clinical outcome of advanced melanoma patients treated with ipilimumab. *Clinical Cancer Research*, vol. 22, no. 12, pp. 2908-2918. ISSN

15573265. DOI 10.1158/1078-0432.CCR-15-2412.

MATSUO, N., AZUMA, K., HATTORI, S., OHTAKE, J., KAWAHARA, A., ISHII, H., TOKITO, T., YAMADA, Kazuhiko, SHIBATA, Y., SHIMOKAWAJI, T., KONDO, T., KATO, T., SAITO, H., YAMADA, Kouzo, SASADA, T. y HOSHINO, T., 2019. Association between soluble immune mediators and tumor responses in patients with nonsmall cell lung cancer treated with anti-PD-1 inhibitor. *International Journal of Cancer*, vol. 144, no. 5, pp. 1170-1179. ISSN 10970215. DOI 10.1002/ijc.31923.

MAZZASCHI, G., FACCHINETTI, F., MISSALE, G., CANETTI, D., MADEDDU, D., ZECCA, A., VENEZIANI, M., GELSOMINO, F., GOLDONI, M., BUTI, S., BORDI, P., AVERSA, F., ARDIZZONI, A., QUAINI, F. y TISEO, M., 2019. The circulating pool of functionally competent NK and CD8+ cells predicts the outcome of anti-PD1 treatment in advanced NSCLC. *Lung Cancer*, vol. 127, no. November 2018, pp. 153-163. ISSN 18728332. DOI 10.1016/j.lungcan.2018.11.038.

MAZZASCHI, G., MADEDDU, D., FALCO, A., BOCCHIALINI, G., GOLDONI, M., SOGNI, F., ARMANI, G., LAGRASTA, C.A., LORUSSO, B., MANGIARACINA, C., VILELLA, R., FRATI, C., ALFIERI, R., AMPOLLINI, L., VENEZIANI, M., SILINI, E.M., ARDIZZONI, A., URBANEK, K., AVERSA, F., QUAINI, F. y TISEO, M., 2018. Low PD-1 expression in cytotoxic CD8  $\beta$  tumor-Infiltrating lymphocytes confers an immune-privileged tissue microenvironment in NSCLC with a prognostic and predictive value. *Clinical Cancer Research*, vol. 24, no. 2, pp. 407-419. ISSN 15573265. DOI 10.1158/1078-0432.CCR-17-2156.

MAZZASCHI, G., MINARI, R., ZECCA, A., CAVAZZONI, A., FERRI, V., MORI, C., SQUADRILLI, A., BORDI, P., BUTI, S., BERSANELLI, M., LEONETTI, A., COSENZA, A., FERRI, L., RAPACCHI, E., MISSALE, G., PETRONINI, P.G., QUAINI, F. y TISEO, M., 2020. Soluble PD-L1 and Circulating CD8+PD-1+ and NK Cells Enclose a Prognostic and Predictive Immune Effector Score in Immunotherapy Treated NSCLC patients. , DOI 10.1016/j.lungcan.2020.07.028.

MEYO, M.T., JOUINOT, A., GIROUX-LEPRIEUR, E., FABRE, E., WISLEZ, M., ALIFANO, M., LEROY, K., BOUDOU-ROUQUETTE, P., TLEMSANI, C., KHOUDOUR, N., ARRONDEAU, J., THOMAS-SCHOEMANN, A., BLONS, H., MANSUET-LUPO, A., DAMOTTE, D., VIDAL, M., GOLDWASSER, F., ALEXANDRE, J. y BLANCHET, B., 2020. Predictive value of soluble PD-1, PD-L1, VEGFA, CD40 ligand and CD44 for nivolumab therapy in advanced non-small cell lung cancer: A case-control study. *Cancers*, vol. 12, no. 2. ISSN 20726694. DOI 10.3390/cancers12020473.

- MEZQUITA, L., AUCLIN, E., FERRARA, R., CHARRIER, M., REMON, J., PLANCHARD, D., PONCE, S., ARES, L.P., LEROY, L., AUDIGIER-VALETTE, C., FELIP, E., ZERÓN-MEDINA, J., GARRIDO, P., BROSSEAU, S., ZALCMAN, G., MAZIERES, J., CAMELA, C., LAHMAR, J., ADAM, J., CHAPUT, N., SORIA, J.C. y BESSE, B., 2018. Association of the lung immune prognostic index with immune checkpoint inhibitor outcomes in patients with advanced non-small cell lung cancer. *JAMA Oncology*, vol. 4, no. 3, pp. 351-357. ISSN 23742445. DOI 10.1001/jamaoncol.2017.4771.
- MIELGO-RUBIO, X., CALVO, V., LUNA, J., REMON, J., MARTÍN, M., BERRAONDO, P., JARABO, J.R., HIGUERA, O., CONDE, E., DE CASTRO, J., PROVENCIO, M., TRANCHO, F.H., LÓPEZ-RÍOS, F. y COUÑAGO, F., 2020. *Immunotherapy moves to the early-stage setting in non-small cell lung cancer: Emerging evidence and the role of biomarkers*. 1 noviembre 2020. S.I.: MDPI AG.
- MOLINA, J.R., YANG, P., CASSIVI, S.D., SCHILD, S.E. y ADJEI, A.A., 2008. Non-small cell lung cancer: epidemiology, risk factors, treatment, and survivorship. *Mayo Clinic Proceedings*, vol. 83, no. 5, pp. 584-94. ISSN 1942-5546. DOI 10.4065/83.5.584.
- MONCAYO, G., LIN, D., MCCARTHY, M.T., WATSON, A.A. y O'CALLAGHAN, C.A., 2017. MICA expression is regulated by cell adhesion and contact in a FAK/Src-dependent manner. *Frontiers in Immunology*, vol. 7, no. JAN, pp. 19. ISSN 16643224. DOI 10.3389/fimmu.2016.00687.
- MORGENSZTERN, D., NG, S.H., GAO, F. y GOVINDAN, R., 2010. Trends in stage distribution for patients with non-small cell lung cancer: A national cancer database survey. *Journal of Thoracic Oncology*, vol. 5, no. 1, pp. 29-33. ISSN 15561380. DOI 10.1097/JTO.0b013e3181c5920c.
- NAIR, S. y DHODAPKAR, M. V., 2017. *Natural killer T cells in cancer immunotherapy*. 22 septiembre 2017. S.I.: Frontiers Media S.A.
- NEMUNAITIS, J., 1993. *Macrophage function activating cytokines: potential clinical application*. 1 abril 1993. S.I.: Elsevier.
- NIELSEN, S.R. y SCHMID, M.C., 2017. *Macrophages as Key Drivers of Cancer Progression and Metastasis*. 2017. S.I.: Hindawi Limited.
- O'DONNELL, J.S., TENG, M.W.L. y SMYTH, M.J., 2019. Cancer immunoediting and resistance to T cell-based immunotherapy. *Nature Reviews Clinical Oncology*, vol. 16, no. 3, pp. 151-167. ISSN 17594782. DOI 10.1038/s41571-018-0142-8.

- OJA, A.E., PIET, B., VAN DER ZWAN, D., BLAAUWGEERS, H., MENSINK, M., DE KIVIT, S., BORST, J., NOLTE, M.A., VAN LIER, R.A.W., STARK, R. y HOMBRINK, P., 2018. Functional heterogeneity of CD4+ tumor-infiltrating lymphocytes with a resident memory phenotype in NSCLC. *Frontiers in Immunology*, vol. 9, no. NOV, pp. 1-15. ISSN 16643224. DOI 10.3389/fimmu.2018.02654.
- PALUCKA, A.K. y COUSSENS, L.M., 2016. *The Basis of Oncoimmunology*. 10 marzo 2016. S.l.: Cell Press.
- PARDOLL, D.M., 2012. *The blockade of immune checkpoints in cancer immunotherapy*. abril 2012. S.l.: s.n.
- PARRA, E.R., URAOKA, N., JIANG, M., COOK, P., GIBBONS, D., FORGET, M.A., BERNATCHEZ, C., HAYMAKER, C., WISTUBA, I.I. y RODRIGUEZ-CANALES, J., 2017. Validation of multiplex immunofluorescence panels using multispectral microscopy for immune-profiling of formalin-fixed and paraffin-embedded human tumor tissues. *Scientific Reports*, vol. 7, no. 1, pp. 1-11. ISSN 20452322. DOI 10.1038/s41598-017-13942-8.
- PARRA, E.R., VILLALOBOS, P., BEHRENS, C., JIANG, M., PATAER, A., SWISHER, S.G., WILLIAM, W.N., ZHANG, Jiexin, LEE, J., CASCONI, T., HEYMACH, J. V., FORGET, M.A., HAYMAKER, C., BERNATCHEZ, C., KALHOR, N., WEISSFERDT, A., MORAN, C., ZHANG, Jianjun, VAPORCIYAN, A., GIBBONS, D.L., SEPESI, B. y WISTUBA, I.I., 2018. Effect of neoadjuvant chemotherapy on the immune microenvironment in non-small cell lung carcinomas as determined by multiplex immunofluorescence and image analysis approaches. *Journal for ImmunoTherapy of Cancer*, vol. 6, no. 1. ISSN 20511426. DOI 10.1186/s40425-018-0368-0.
- PESCE, S., GREPPI, M., GROSSI, F., DEL ZOTTO, G., MORETTA, L., SIVORI, S., GENOVA, C. y MARCENARO, E., 2019. PD/1-PD-Ls checkpoint: Insight on the potential role of NK cells. *Frontiers in Immunology*, vol. 10, no. JUN, pp. 1-8. ISSN 16643224. DOI 10.3389/fimmu.2019.01242.
- PIRCHER, A., GAMERITH, G., AMANN, A., REINOLD, S., POPPER, H., GÄCHTER, A., PALL, G., WÖLL, E., JAMNIG, H., GASTL, G., WOLF, A.M., HILBE, W. y WOLF, D., 2014. Neoadjuvant chemo-immunotherapy modifies CD4+CD25+ regulatory T cells (Treg) in non-small cell lung cancer (NSCLC) patients. *Lung Cancer*, vol. 85, no. 1, pp. 81-87. ISSN 18728332. DOI 10.1016/j.lungcan.2014.04.001.
- PLÖNES, T., KROHN, A., BURGER, M., VEELKEN, H., PASSLICK, B., MÜLLER-QUERNHEIM, J. y ZISSEL, G., 2012. Serum Level of CC-Chemokine Ligand 18 Is Increased in Patients with Non-Small-Cell Lung Cancer and Correlates with Survival Time in Adenocarcinomas. En: A. WAZIRI (ed.), *PLoS ONE*,

vol. 7, no. 7, pp. e41746. ISSN 1932-6203. DOI 10.1371/journal.pone.0041746.

POSTMUS, P.E., KERR, K.M., OUDKERK, M., SENAN, S., WALLER, D.A., VANSTEENKISTE, J., ESCRIU, C. y PETERS, S., 2017. Early and locally advanced non-small-cell lung cancer (NSCLC): ESMO Clinical Practice Guidelines for diagnosis, treatment and follow-up. *Annals of Oncology*, vol. 28, no. Supplement 4, pp. iv1-iv21. ISSN 15698041. DOI 10.1093/annonc/mdx222.

PÖTTGEN, C., STUSCHKE, M., GRAUPNER, B., THEEGARTEN, D., GAULER, T., JENDROSSEK, V., FREITAG, L., JAWAD, J.A., GKIKA, E., WOHLSCHLAEGER, J., WELTER, S., HOICZYK, M., SCHULER, M., STAMATIS, G. y EBERHARDT, W., 2015. Prognostic model for long-term survival of locally advanced non-small-cell lung cancer patients after neoadjuvant radiochemotherapy and resection integrating clinical and histopathologic factors. *BMC Cancer*, vol. 15, no. 1, pp. 363. ISSN 14712407. DOI 10.1186/s12885-015-1389-4.

PRAJAPATI, K., PEREZ, C., ROJAS, L.B.P., BURKE, B. y GUEVARA-PATINO, J.A., 2018. Functions of NKG2D in CD8+ T cells: an opportunity for immunotherapy. *Cellular and Molecular Immunology*, vol. 15, no. 5, pp. 470-479. ISSN 16727681. DOI 10.1038/cmi.2017.161.

PRAKASH, Y., THOMPSON, M.A., MEUCHEL, L., PABELICK, C.M., MANTILLA, C.B., ZAIDI, S. y MARTIN, R.J., 2010. *Neurotrophins in lung health and disease*. junio 2010. S.l.: NIH Public Access.

PROVENCIO, M., CARCERENY, E., RODRÍGUEZ-ABREU, D., LÓPEZ-CASTRO, R., GUIRADO, M., CAMPS, C., BOSCH-BARRERA, J., GARCÍA-CAMPELO, R., ORTEGA-GRANADOS, A.L., GONZÁLEZ-LARRIBA, J.L., CASAL-RUBIO, J., DOMINE, M., MASSUTÍ, B., SALA, M.Á., BERNABÉ, R., ORAMAS, J. y DEL BARCO, E., 2019. Lung cancer in Spain: Information from the Thoracic Tumors Registry (TTR study). *Translational Lung Cancer Research*, vol. 8, no. 4, pp. 461-475. ISSN 22264477. DOI 10.21037/tlcr.2019.08.05.

PROVENCIO, M., NADAL, E., INSA, A., GARCÍA-CAMPELO, M.R., CASAL-RUBIO, J., DÓMINE, M., MAJEM, M., RODRÍGUEZ-ABREU, D., MARTÍNEZ-MARTÍ, A., DE CASTRO CARPEÑO, J., COBO, M., LÓPEZ VIVANCO, G., DEL BARCO, E., BERNABÉ CARO, R., VIÑOLAS, N., BARNETO ARANDA, I., VITERI, S., PEREIRA, E., ROYUELA, A., CASARRUBIOS, M., SALAS ANTÓN, C., PARRA, E.R., WISTUBA, I., CALVO, V., LAZA-BRIVIESCA, R., ROMERO, A., MASSUTI, B. y CRUZ-BERMÚDEZ, A., 2020. Neoadjuvant chemotherapy and nivolumab in resectable non-small-cell lung cancer (NADIM): an open-label, multicentre, single-arm, phase 2 trial. *The Lancet Oncology*, ISSN 14745488. DOI 10.1016/S1470-2045(20)30453-8.

- QIU, J., CHE, G., LIU, F., SHA, X., JU, S., MA, H. y FENG, L., 2019. The detection and clinical significance of peripheral regulatory CD4+CD25hiCD127low T cells in patients with non-small cell lung cancer. *Clinical and Translational Oncology*, vol. 21, no. 10, pp. 1343-1347. ISSN 16993055. DOI 10.1007/s12094-019-02063-5.
- QU, Y., EMOTO, K., EGUCHI, T., ALY, R.G., ZHENG, H., CHAFT, J.E., TAN, K.S., JONES, D.R., KRIS, M.G., ADUSUMILLI, P.S. y TRAVIS, W.D., 2019. Pathologic Assessment After Neoadjuvant Chemotherapy for NSCLC: Importance and Implications of Distinguishing Adenocarcinoma From Squamous Cell Carcinoma. *Journal of Thoracic Oncology*, vol. 14, no. 3, pp. 482-493. ISSN 15561380. DOI 10.1016/j.jtho.2018.11.017.
- RAMNATH, N., DILLING, T.J., HARRIS, L.J., KIM, A.W., MICHAUD, G.C., BALEKIAN, A.A., DIEKEMPER, R., DETTERBECK, F.C. y ARENBERG, D.A., 2013. Treatment of stage III non-small cell lung cancer: Diagnosis and management of lung cancer, 3rd ed: American college of chest physicians evidence-based clinical practice guidelines. *Chest*, vol. 143, no. 5 SUPPL. ISSN 00123692. DOI 10.1378/chest.12-2360.
- REN, D., HUA, Y., YU, B., YE, X., HE, Z., LI, C., WANG, J., MO, Y., WEI, X., CHEN, Y., ZHOU, Y., LIAO, Q., WANG, H., XIANG, B., ZHOU, M., LI, X., LI, G., LI, Y., ZENG, Z. y XIONG, W., 2020. *Predictive biomarkers and mechanisms underlying resistance to PD1/PD-L1 blockade cancer immunotherapy*. 30 diciembre 2020. S.l.: BioMed Central Ltd.
- REUSS, J.E., ANAGNOSTOU, V., COTTRELL, T.R., SMITH, K.N., VERDE, F., ZAHURAK, M., LANIS, M., MURRAY, J.C., CHAN, H.Y., MCCARTHY, C., WANG, D., WHITE, J.R., YANG, S., BATTAFARANO, R., BRODERICK, S., BUSH, E., BROCK, M., HA, J., JONES, D., MERGHOU, T., TAUBE, J., VELCULESCU, V.E., ROSNER, G., ILLEI, P., PARDOLL, D.M., TOPALIAN, S., NAIDOO, J., LEVY, B., HELLMANN, M.D., BRAHMER, J.R., CHAFT, J.E. y FORDE, P.M., 2020. Neoadjuvant nivolumab plus ipilimumab in resectable non-small cell lung cancer. *J Immunother Cancer*, vol. 8, pp. 1282. DOI 10.1136/jitc-2020-001282.
- RIBAS, A., SHIN, D.S., ZARETSKY, J., FREDERIKSEN, J., CORNISH, A., AVRAMIS, E., SEJA, E., KIVORK, C., SIEBERT, J., KAPLAN-LEFKO, P., WANG, X., CHMIELOWSKI, B., GLASPY, J.A., TUMEH, P.C., CHODON, T., PE'ER, D. y NA COMIN-ANDUIX, B., 2016. PD-1 Blockade Expands Intratumoral Memory T Cells. *Cancer Immunol Res*, vol. 4, no. 3. DOI 10.1158/2326-6066.CIR-15-0210.
- RICCI, A., GRECO, S., MARIOTTA, S., FELICI, L., BRONZETTI, E., CAVAZZANA, A., CARDILLO, G., AMENTA,

F., BISETTI, A. y BARBOLINI, G., 2001. Neurotrophins and neurotrophin receptors in human lung cancer. *American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology*, vol. 25, no. 4, pp. 439-446. ISSN 10441549. DOI 10.1165/ajrcmb.25.4.4470.

RODRÍGUEZ CORTÉS, O., 2017. Monocito y macrófago, su función y disfunción y su relación con la disfunción metabólica, una visión general. [en línea]. [Consulta: 8 febrero 2021]. Disponible en: <https://es.slideshare.net/sindromemetabolico/monocito-y-macrphago-su-funcin-y-disfuncin-y-su-relacin-con-la-disfuncin-metablica-una-visin-general>.

ROTH, J.A., FOSSELLA, F., KOMAKI, R., RYAN, M.B., PUTNAM, J.B., LEE, J.S., DHINGRA, H., DE CARO, L., CHASEN, M., MCGAVRAN, M., ATKINSON, E.N. y HONG, W.K., 1994. A Randomized Trial Comparing Perioperative Chemotherapy and Surgery With Surgery Alone in Resectable Stage IIIA Non-Small-Cell Lung Cancer. *JNCI Journal of the National Cancer Institute*, vol. 86, no. 9, pp. 673-680. ISSN 0027-8874. DOI 10.1093/jnci/86.9.673.

RUANO-RAVIÑA, A., PROVENCIO, M., CALVO DE JUAN, V., CARCERENY, E., MORAN, T., RODRIGUEZ-ABREU, D., LÓPEZ-CASTRO, R., CUADRADO ALBITE, E., GUIRADO, M., GÓMEZ GONZÁLEZ, L., MASSUTÍ, B., ORTEGA GRANADOS, A.L., BLASCO, A., COBO, M., GARCIA-CAMPELO, R., BOSCH, J., TRIGO, J., JUAN, Ó., AGUADO DE LA ROSA, C., DÓMINE, M., SALA, M., ORAMAS, J., CASAL-RUBIO, J. y CEREZO, S., 2020. Lung cancer symptoms at diagnosis: Results of a nationwide registry study. *ESMO Open*, vol. 5, no. 6. ISSN 20597029. DOI 10.1136/esmoopen-2020-001021.

RUCK, T., BITTNER, S., GROSS, C.C., BREUER, J., ALBRECHT, S., KORR, S., GÖBEL, K., PANKRATZ, S., HENSCHEL, C.M., SCHWAB, N., STASZEWSKI, O., PRINZ, M., KUHLMANN, T., MEUTH, S.G. y WIENDL, H., 2013. CD4+NKG2D+ T cells exhibit enhanced migratory and encephalitogenic properties in Neuroinflammation. *PLoS ONE*, vol. 8, no. 11. ISSN 19326203. DOI 10.1371/journal.pone.0081455.

SAKAGUCHI, S., ONO, M., SETOGUCHI, R., YAGI, H., HORI, S., FEHERVARI, Z., SHIMIZU, J., TAKAHASHI, T. y NOMURA, T., 2006. *Foxp3+CD25+CD4+ natural regulatory T cells in dominant self-tolerance and autoimmune disease*. 1 agosto 2006. S.l.: John Wiley & Sons, Ltd.

SAMUELS, S., FERNS, D.M., MEIJER, D., VAN STRAALLEN, J.P., BUIST, M.R., ZIJLMANS, H.J., KENTER, G.G. y JORDANOVA, E.S., 2015. High levels of soluble MICA are significantly related to increased disease-free and disease-specific survival in patients with cervical adenocarcinoma. *Tissue Antigens*, vol. 85, no. 6, pp. 476-483. ISSN 00012815. DOI 10.1111/tan.12562.



- SCHREIBER, R.D., OLD, L.J. y SMYTH, M.J., 2011. *Cancer immunoediting: Integrating immunity's roles in cancer suppression and promotion*. 25 marzo 2011. S.l.: s.n.
- SENOVILLA, L., VACCHELLI, E., GALON, J., ADJEMIAN, S., EGGERMONT, A., FRIDMAN, W.H., SAUTÈS-FRIDMAN, C., MA, Y., TARTOUR, E., ZITVOGEL, L., KROEMER, G. y GALLUZZI, L., 2012. Trial watch prognostic and predictive value of the immune infiltrate in cancer. *Onc Immunology*, vol. 1, no. 8, pp. 1323-1343. ISSN 21624011. DOI 10.4161/onci.22009.
- SHAO, Z., BHARADWAJ, A.S., MCGEE, H.S., MAKINDE, T.O. y AGRAWAL, D.K., 2009. Fms-like tyrosine kinase 3 ligand increases a lung DC subset with regulatory properties in allergic airway inflammation. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, vol. 123, no. 4, pp. 917. ISSN 00916749. DOI 10.1016/j.jaci.2009.01.052.
- SHARMA, P. y ALLISON, J.P., 2015. Immune checkpoint targeting in cancer therapy: Toward combination strategies with curative potential. *Cell*, vol. 161, no. 2, pp. 205-214. ISSN 10974172. DOI 10.1016/j.cell.2015.03.030.
- SHENG, S.Y., GU, Y., LU, C.G., TANG, Y.Y., ZOU, J.Y., ZHANG, Y.Q., WANG, R.F. y HONG, H., 2017. The Characteristics of Naive-like T Cells in Tumor-infiltrating Lymphocytes from Human Lung Cancer. *Journal of Immunotherapy*, vol. 40, no. 1, pp. 1-10. ISSN 15374513. DOI 10.1097/CJI.0000000000000147.
- SHIMASAKI, N., JAIN, A. y CAMPANA, D., 2020. NK cells for cancer immunotherapy. *Nature Reviews Drug Discovery*, vol. 19, no. 3, pp. 200-218. ISSN 1474-1776. DOI 10.1038/s41573-019-0052-1.
- SHU, C.A., GAINOR, J.F., AWAD, M.M., CHIUZAN, C., GRIGG, C.M., PABANI, A., GAROFANO, R.F., STOOPLER, M.B., CHENG, S.K., WHITE, A., LANUTI, M., D'OVIDIO, F., BACCHETTA, M., SONETT, J.R., SAQI, A. y RIZVI, N.A., 2020. Neoadjuvant atezolizumab and chemotherapy in patients with resectable non-small-cell lung cancer: an open-label, multicentre, single-arm, phase 2 trial. *The Lancet Oncology*, vol. 2045, no. 20, pp. 1-10. ISSN 14745488. DOI 10.1016/S1470-2045(20)30140-6.
- SIEGEL, R.L., MILLER, K.D., FUCHS, H.E. y JEMAL, A., 2021. Cancer Statistics, 2021. *CA: a cancer journal for clinicians*, vol. 71, no. 1. ISSN 1542-4863. DOI 10.3322/caac.21654.
- SOCIEDAD ESPAÑOLA DE ONCOLOGÍA MÉDICA, 2019. Toxicidad de los tratamientos oncológicos - SEOM. [en línea]. [Consulta: 15 enero 2021]. Disponible en: <https://seom.org/guia-actualizada->

de-tratamientos/toxicidad-de-los-tratamientos-oncologicos?start=12.

SOO, R.A., CHEN, Z., YAN TENG, R.S., TAN, H.L., IACOPETTA, B., TAI, B.C. y SOONG, R., 2018. Prognostic significance of immune cells in non-small cell lung cancer: Meta-analysis. *Oncotarget*, vol. 9, no. 37, pp. 24801-24820. ISSN 19492553. DOI 10.18632/oncotarget.24835.

STANKOVIC, B., BJØRHOVDE, H.A.K., SKARSHAUG, R., AAMODT, H., FRAFJORD, A., MÜLLER, E., HAMMARSTRÖM, C., BERAKI, K., BÆKKEVOLD, E.S., WOLDBÆK, P.R., HELLAND, Å., BRUSTUGUN, O.T., ØYNEBRÅTEN, I. y CORTHAY, A., 2018. Immune Cell Composition in Human Non-small Cell Lung Cancer. *Frontiers in immunology*, vol. 9, pp. 3101. ISSN 16643224. DOI 10.3389/fimmu.2018.03101.

STRAUSS, L., MAHMOUD, M.A.A., WEAVER, J.D., TIJARO-OVALLE, N.M., CHRISTOFIDES, A., WANG, Q., PAL, R., YUAN, M., ASARA, J., PATSOUKIS, N. y BOUSSIOTIS, V.A., 2020. Targeted deletion of PD-1 in myeloid cells induces antitumor immunity. *Science immunology*, vol. 5, no. 43, pp. 1-15. ISSN 24709468. DOI 10.1126/sciimmunol.aay1863.

THOMMEN, D.S., KOELZER, V.H., HERZIG, P., ROLLER, A., TREFNY, M., DIMELOE, S., KIALAINEN, A., HANHART, J., SCHILL, C., HESS, C., PRINCE, S.S., WIESE, M., LARDINOIS, D., HO, P.C., KLEIN, C., KARANIKAS, V., MERTZ, K.D., SCHUMACHER, T.N. y ZIPPELIUS, A., 2018. A transcriptionally and functionally distinct pd-1 + cd8 + t cell pool with predictive potential in non-small-cell lung cancer treated with pd-1 blockade. *Nature Medicine*, vol. 24, no. 7. ISSN 1546170X. DOI 10.1038/s41591-018-0057-z.

TOPALIAN, S.L., TAUBE, J.M., ANDERS, R.A. y PARDOLL, D.M., 2016. *Mechanism-driven biomarkers to guide immune checkpoint blockade in cancer therapy*. 26 abril 2016. S.l.: Nature Publishing Group.

TRAVIS, W.D., BRAMBILLA, E., NICHOLSON, A.G., YATABE, Y., AUSTIN, J.H.M., BEASLEY, M.B., CHIRIEAC, L.R., DACIC, S., DUHIG, E., FLIEDER, D.B., GEISINGER, K., HIRSCH, F.R., ISHIKAWA, Y., KERR, K.M., NOGUCHI, M., PELOSI, G., POWELL, C.A., TSAO, M.S. y WISTUBA, I., 2015. *The 2015 World Health Organization Classification of Lung Tumors: Impact of Genetic, Clinical and Radiologic Advances since the 2004 Classification*. 26 septiembre 2015. S.l.: Elsevier Inc.

TRAVIS, W.D., DACIC, S., WISTUBA, I., SHOLL, L., ADUSUMILLI, P., BUBENDORF, L., BUNN, P., CASCONI, T., CHAFT, J., CHEN, G., CHOU, T., COOPER, W., ERASMUS, J.J., FERREIRA, G., GOO, J., HEYMACH, J., HIRSCH, F.R., HORINOUCI, H., KERR, K., KRIS, M., JAIN, D., KIM, Y.T., LOPEZ-RIOS, F. y LU, S.,

2020. IASLC Multidisciplinary Recommendations for Pathologic Assessment of Lung Cancer Resection Specimens After Neoadjuvant Therapy. *Journal of Thoracic Oncology*, pp. 1-32. ISSN 1556-0864. DOI 10.1016/j.jtho.2020.01.005.
- TUMEH, P.C., HARVIEW, C.L., YEARLEY, J.H., SHINTAKU, I.P., TAYLOR, E.J.M., ROBERT, L., CHMIELOWSKI, B., SPASIC, M., HENRY, G., CIOBANU, V., WEST, A.N., CARMONA, M., KIVORK, C., SEJA, E., CHERRY, G., GUTIERREZ, A.J., GROGAN, T.R., MATEUS, C., TOMASIC, G., GLASPY, J.A., EMERSON, R.O., ROBINS, H., PIERCE, R.H., ELASHOFF, D.A., ROBERT, C. y RIBAS, A., 2014. PD-1 blockade induces responses by inhibiting adaptive immune resistance. *Nature*, vol. 515, no. 7528, pp. 568-571. ISSN 14764687. DOI 10.1038/nature13954.
- TUMINELLO, S., VELUSWAMY, R., LIEBERMAN-CRIBBIN, W., GNJATIC, S., PETRALIA, F., WANG, P., FLORES, R. y TAIOLI, E., 2019. Prognostic value of immune cells in the tumor microenvironment of early-stage lung cancer: A meta-analysis. *Oncotarget*, vol. 10, no. 67, pp. 7142-7155. ISSN 19492553. DOI 10.18632/oncotarget.27392.
- TUNGER, A., SOMMER, U., WEHNER, R., KUBASCH, A.S., GRIMM, M.-O., BACHMANN, M.P., PLATZBECKER, U., BORNHÄUSER, M., BARETTON, G. y SCHMITZ, M., 2019. The Evolving Landscape of Biomarkers for Anti-PD-1 or Anti-PD-L1 Therapy. *Journal of Clinical Medicine*, vol. 8, no. 10, pp. 1534. ISSN 2077-0383. DOI 10.3390/jcm8101534.
- URYVAEV, A., PASSHAK, M., HERSHKOVITS, D., SABO, E. y BAR-SELA, G., 2018. The role of tumor-infiltrating lymphocytes (TILs) as a predictive biomarker of response to anti-PD1 therapy in patients with metastatic non-small cell lung cancer or metastatic melanoma. *Medical Oncology*, vol. 35, no. 3. ISSN 1559131X. DOI 10.1007/s12032-018-1080-0.
- VALENZUELA-MEMBRIVES, M. del M., PEREA-GARCÍA, F., SANCHEZ-PALENCIA, A., RUIZ-CABELLO, F., GÓMEZ-MORALES, M., MIRANDA-LEÓN, M.T., GALINDO-ANGEL, I. y FÁREZ-VIDAL, M.E., 2016. Progressive changes in composition of lymphocytes in lung tissues from patients with non-small-cell lung cancer. *Oncotarget*, vol. 7, no. 44, pp. 71608-71619. ISSN 19492553. DOI 10.18632/oncotarget.12264.
- VIVIER, E., TOMASELLO, E., BARATIN, M., WALZER, T. y UGOLINI, S., 2008. Functions of natural killer cells. *Nature Immunology*, vol. 9, no. 5, pp. 503-510. ISSN 15292908. DOI 10.1038/ni1582.
- WAGNER, G., STOLLENWERK, H.K., KLERINGS, I., PECHERSTORFER, M., GARTLEHNER, G. y SINGER, J., 2020. Efficacy and safety of immune checkpoint inhibitors in patients with advanced non-small

cell lung cancer (NSCLC): a systematic literature review. *OncolImmunology*, vol. 9, no. 1. ISSN 2162402X. DOI 10.1080/2162402X.2020.1774314.

WALDMAN, A.D., FRITZ, J.M. y LENARDO, M.J., 2020. *A guide to cancer immunotherapy: from T cell basic science to clinical practice*. 20 mayo 2020. S.l.: Nature Research.

WALDMANN, T.A., 1991. The interleukin-2 receptor. *Journal of Biological Chemistry*, vol. 266, no. 5, pp. 2681-2684. ISSN 00219258. DOI 10.1016/S0021-9258(18)49895-X.

WANG, J., ZOU, Z.H., XIA, H.L., HE, J.X., ZHONG, N.S. y TAO, A.L., 2012. Strengths and weaknesses of immunotherapy for advanced non-small-cell lung cancer: A meta-analysis of 12 randomized controlled trials. *PLoS ONE*, vol. 7, no. 3. ISSN 19326203. DOI 10.1371/journal.pone.0032695.

WANG, K., WEI, G. y LIU, D., 2012. CD19: a biomarker for B cell development, lymphoma diagnosis and therapy. *Experimental Hematology & Oncology*, vol. 1, no. 1, pp. 36. ISSN 2162-3619. DOI 10.1186/2162-3619-1-36.

WANG, Q., ZHANG, J., TU, H., LIANG, D., CHANG, D.W., YE, Y. y WU, X., 2019. Soluble immune checkpoint-related proteins as predictors of tumor recurrence, survival, and T cell phenotypes in clear cell renal cell carcinoma patients. *Journal for ImmunoTherapy of Cancer*, vol. 7, no. 1, pp. 1-9. ISSN 20511426. DOI 10.1186/s40425-019-0810-y.

WENSVEEN, F.M., JELENČIĆ, V. y POLIĆ, B., 2018. NKG2D: A master regulator of immune cell responsiveness. *Frontiers in Immunology*, vol. 9, no. MAR. ISSN 16643224. DOI 10.3389/fimmu.2018.00441.

WESSOLLY, M., STEPHAN-FALKENAU, S., STREUBEL, A., WERNER, R., BORCHERT, S., GRIFF, S., MAIRINGER, E., WALTER, R.F.H., BAUER, T., EBERHARDT, W.E.E., BLUM, T.G., SCHMID, K.W., KOLLMEIER, J., MAIRINGER, T. y MAIRINGER, F.D., 2020. A novel epitope quality-based immune escape mechanism reveals patient's suitability for immune checkpoint inhibition. *Cancer Management and Research*, vol. 12, pp. 7881-7890. ISSN 11791322. DOI 10.2147/CMAR.S258396.

WU, S.-P., LIAO, R.-Q., TU, H.-Y., WANG, W.-J., DONG, Z.-Y., HUANG, S.-M., GUO, W.-B., GOU, L.-Y., SUN, H.-W., ZHANG, Q., XIE, Z., YAN, L.-X., SU, J., YANG, J.-J., ZHONG, W.-Z., ZHANG, X.-C. y WU, Y.-L., 2018. Stromal PD-L1-Positive Regulatory T cells and PD-1-Positive CD8-Positive T cells Define the Response of Different Subsets of Non-Small Cell Lung Cancer to PD-1/PD-L1 Blockade

- Immunotherapy. *Journal of thoracic oncology: official publication of the International Association for the Study of Lung Cancer*, vol. 13, no. 4, pp. 521-532. ISSN 1556-1380. DOI 10.1016/j.jtho.2017.11.132.
- YU, P. y FU, Y.X., 2006. *Tumor-infiltrating T lymphocytes: Friends or foes?* 30 marzo 2006. S.l.: Nature Publishing Group.
- ZAPPASODI, R., BUDHU, S., HELLMANN, M.D., POSTOW, M.A., SENBABAOGU, Y., MANNE, S., GASMI, B., LIU, C., ZHONG, H., LI, Y., HUANG, A.C., HIRSCHHORN-CYMERMAN, D., PANAGEAS, K.S., WHERRY, E.J., MERGHOU, T. y WOLCHOK, J.D., 2018. Non-conventional Inhibitory CD4+Foxp3-PD-1hi T Cells as a Biomarker of Immune Checkpoint Blockade Activity. *Cancer Cell*, vol. 33, no. 6, pp. 1017- 1032.e7. ISSN 18783686. DOI 10.1016/j.ccell.2018.05.009.
- ZELBA, H., BOCHEM, J., PAWELEC, G., GARBE, C., WISTUBA-HAMPRECHT, K. y WEIDE, B., 2018. Accurate quantification of T-cells expressing PD-1 in patients on anti-PD-1 immunotherapy. *Cancer immunology, immunotherapy : CII*, vol. 67, no. 12, pp. 1845-1851. ISSN 1432-0851. DOI 10.1007/s00262-018-2244-7.
- ZHENG, H., LIU, X., ZHANG, J., RICE, S.J., WAGMAN, M., KONG, Y., ZHU, L., ZHU, J., JOSHI, M. y BELANI, C.P., 2016. Expression of PD-1 on CD4+ T cells in peripheral blood associates with poor clinical outcome in non-small cell lung cancer. *Oncotarget*, vol. 7, no. 35. ISSN 1949-2553. DOI 10.18632/oncotarget.9316.
- ZINNER, R., AXELROD, R., SOLOMIDES, C.C., COWAN, S., LEIBY, B., BHATIA, A.K., SUNDERMEYER, M.L., HOOPER, D.C., HARSHYNE, L., LU-YAO, G.L., QUEREDA-BERNABEU, B.C., WHANG, S.C., OHARA, S.C., VERNAU, D.C., WERNER-WASIK, M., LU, B., JOHNSON, J.M., SCOTT, W.C., ARGIRIS, A. y EVANS, N.R., 2020. Neoadjuvant nivolumab (N) plus cisplatin (C)/pemetrexed (P) or cisplatin /gemcitabine (G) in resectable NSCLC. *Journal of Clinical Oncology*, vol. 38, no. 15\_suppl, pp. 9051-9051. ISSN 0732-183X. DOI 10.1200/jco.2020.38.15\_suppl.9051.
- ZOU, W., WOLCHOK, J.D. y CHEN, L., 2016. PD-L1 (B7-H1) and PD-1 pathway blockade for cancer therapy: Mechanisms, response biomarkers, and combinations. *Science Translational Medicine*, vol. 8, no. 328. ISSN 19466242. DOI 10.1126/scitranslmed.aad7118.

## 9 ANEXO I. MATERIAL SUPLEMENTARIO

**Tablas 1, 2 y 3. Comparación de las poblaciones inmunitarias celulares en sangre al momento del diagnóstico (pre tratamiento) y después del tratamiento neo-adyuvante (post tratamiento) con la respuesta patológica.** Se indican las medianas de cada variable con sus intercuartiles (Q1 y Q3) en pacientes con respuesta patológica completa (CPR) y pacientes con respuesta patológica no completa (no CPR), así como el p-valor obtenido del análisis estadístico de Mann-Whitney. Las variables representadas son porcentajes de células positivas para cada marcador y la intensidad de la señal (MFI) del marcador de interés.

TABLA 1	PRE TRATAMIENTO			POST TRATAMIENTO		
Células B	CPR (Q1-Q3)	NO-CPR (Q1-Q3)	P-VALOR	CPR (Q1-Q3)	NO-CPR (Q1-Q3)	P-VALOR
CD3-CD19+	18,70 (14,25-26,70)	22,25 (15,85-37,68)	0,262	20,80 (7,70-32,65)	17,90 (13,60-32,03)	0,961
CD3-CD19+_MFICD19+	1856,00 (1641,50-2192,50)	1421,50 (1298,00-1657,25)	0,057	1766,00 (1555,00-2603,50)	1471,50 (1140,75-1956,50)	0,036
CD3-CD19+CD25+	36,60 (30,70-39,70)	35,20 (33,30-44,98)	0,626	37,90 (31,55-47,25)	40,95 (31,20-56,68)	0,643
CD3-CD19+CD25+_MFICD25+	279,00 (267,50-282,50)	277,00 (268,25-303,00)	0,807	276,00 (265,00-292,00)	286,00 (270,00-312,00)	0,494
CD3-CD19+CTLA4+	0,41 (0,26-0,58)	0,54 (0,29-1,00)	0,393	0,41 (0,31-0,65)	0,43 (0,32-0,79)	0,733
CD3-CD19+CTLA4+_MFICTLA4+	246,00 (226,00-260,50)	230,00 (219,00-253,00)	0,379	233,00 (224,50-236,50)	238,00 (219,50-255,00)	0,622
CD3-CD19+CD19hi	2,83 (1,51-4,59)	1,90 (1,28-3,51)	0,770	2,52 (2,30-5,70)	3,46 (1,89-5,74)	0,961
CD3-CD19+CD19hi_MFICD19+	3804,50 (2727,00-4226,25)	2898,00 (2203,75-3676,50)	0,280	3970,00 (3193,50-5257,50)	2882,00 (2118,50-3518,50)	0,030
CD3-CD19+CD19hiCD25+	73,80 (55,85-85,05)	74,70 (67,50-81,25)	0,942	78,90 (59,80-86,10)	82,55 (75,15-88,35)	0,435
CD3-CD19+CD19hiCD25+_MFICD25+	348,00 (323,25-384,75)	355,00 (314,75-418,25)	0,959	370,00 (314,00-450,00)	387,00 (272,00-438,25)	0,751
CD3-CD19+CD19hiCTLA4+	0,00 (0,00-1,34)	0,00 (0,00-1,71)	0,907	0,00 (0,00-1,43)	0,37 (0,00-3,60)	0,494
CD3-CD19+CD19hiCTLA4+_MFICTLA4+	222,00 (214,00-227,00)	213,00 (209,75-218,50)	0,389	215,00 (211,00-224,50)	214,50 (213,00-216,75)	1,000
Monocitos	CPR (Q1-Q3)	NO-CPR (Q1-Q3)	P-VALOR	CPR (Q1-Q3)	NO-CPR (Q1-Q3)	P-VALOR
Clásicos	83,20 (58,75-90,40)	73,15 (57,13-84,85)	0,329	86,70 (81,50-89,35)	83,80 (80,90-85,03)	0,204
CD14++CD16-CD107a+	0,81 (0,18-3,68)	2,09 (0,31-17,53)	0,526	0,75 (0,19-2,58)	0,44 (0,21-10,04)	0,733
CD14++CD16-CD107a+_MFICD107a+	513,00 (502,00-562,50)	555,00 (523,00-582,25)	0,118	524,00 (516,50-540,00)	547,00 (523,75-586,75)	0,164
CD14++CD16-CTLA4+	0,08 (0,06-0,21)	0,30 (0,17-0,38)	0,026	0,15 (0,08-0,26)	0,13 (0,08-0,25)	0,826
CD14++CD16-CTLA4+_MFICTLA4+	297,00 (286,50-321,50)	284,50 (280,75-304,75)	0,164	307,00 (295,00-322,50)	322,50 (292,75-342,75)	0,435
CD14++CD16-Nkp44+	14,40 (3,35-40,40)	13,85 (7,30-46,38)	0,204	11,60 (4,95-40,35)	22,90 (7,49-33,43)	0,845
CD14++CD16-Nkp44+_MFINKp44+	478,00 (448,50-507,00)	489,50 (452,50-585,50)	0,526	465,00 (437,50-494,50)	457,50 (450,25-522,75)	0,733
CD14++CD16-CD69+	25,80 (11,90-49,05)	19,80 (9,40-80,75)	0,922	21,80 (12,34-35,30)	24,05 (15,30-43,50)	0,591
CD14++CD16-CD69+_MFICD69+	701,00 (681,50-769,50)	678,50 (662,25-985,50)	0,272	696,00 (674,00-740,00)	692,50 (664,00-772,25)	0,864
CD14++CD16-NKG2D+	1,56 (0,63-3,91)	2,63 (1,01-8,78)	0,354	0,86 (0,70-2,53)	4,24 (1,48-9,41)	0,051
CD14++CD16-NKG2D+_MFINKG2D+	291,00 (288,00-306,00)	295,00 (289,25-300,00)	0,750	294,00 (289,00-310,50)	295,50 (290,00-306,75)	0,941
CD14++CD16-PD1+	11,50 (2,14-30,95)	9,19 (3,60-42,35)	0,495	8,41 (4,18-36,00)	15,45 (3,32-26,65)	0,733
CD14++CD16-PD1+_MFIPD1+	451,00 (434,00-486,00)	476,00 (428,75-535,25)	0,883	448,00 (436,50-472,50)	449,00 (430,50-477,50)	0,884
Intermedios	2,69 (1,16-3,51)	2,72 (1,82-5,31)	0,407	1,70 (0,80-3,61)	1,36 (1,09-5,13)	0,678
CD14++CD16+CD107a+	2,44 (1,65-10,53)	3,36 (1,53-16,50)	0,626	2,11 (0,35-3,94)	3,98 (0,91-9,24)	0,367
CD14++CD16+CD107a+_MFICD107a+	691,00 (588,00-854,00)	735,00 (562,00-920,00)	0,979	651,00 (600,25-770,25)	643,00 (567,00-819,00)	0,913
CD14++CD16+CTLA4+	2,27 (0,55-3,00)	1,62 (0,91-3,33)	0,435	0,95 (0,46-1,46)	1,82 (0,40-4,56)	0,421
CD14++CD16+CTLA4+_MFICTLA4+	321,00 (311,00-380,00)	366,50 (340,00-436,50)	0,329	310,00 (291,00-366,00)	339,00 (322,00-355,50)	0,484
CD14++CD16+Nkp44+	26,00 (8,39-45,65)	29,50 (7,83-62,88)	0,407	14,70 (5,85-46,35)	31,35 (15,90-43,68)	0,407
CD14++CD16+Nkp44+_MFINKp44+	558,00 (507,50-616,00)	637,50 (558,50-708,00)	0,272	512,00 (482,50-560,00)	517,00 (479,25-554,75)	0,807
CD14++CD16+CD69+	17,30 (7,26-28,50)	11,45 (5,84-44,20)	0,661	8,81 (5,47-16,85)	25,95 (7,02-32,83)	0,157
CD14++CD16+CD69+_MFICD69+	1250,00 (1033,00-1908,50)	951,50 (754,00-1109,75)	0,017	885,00 (759,00-1278,50)	850,50 (798,50-918,00)	0,272
CD14++CD16+NKG2D+	7,95 (3,01-14,20)	7,06 (4,03-13,48)	0,807	5,68 (3,28-6,91)	13,25 (4,85-19,25)	0,071
CD14++CD16+NKG2D+_MFINKG2D+	350,00 (322,50-360,50)	339,00 (309,00-439,75)	0,751	338,00 (324,00-358,50)	343,50 (335,25-365,50)	0,558
CD14++CD16+PD1+	20,40 (6,52-39,85)	30,40 (5,69-61,48)	0,591	13,10 (6,66-47,40)	21,50 (9,78-44,70)	0,845
CD14++CD16+PD1+_MFIPD1+	597,00 (514,00-666,00)	591,00 (471,25-636,00)	0,678	475,00 (464,00-522,00)	490,50 (458,75-523,25)	0,807
No-clásicos	1,83 (0,68-2,75)	1,61 (0,74-3,46)	0,696	0,37 (0,26-0,71)	0,57 (0,33-0,90)	0,526
CD14+CD16+CD107a+	18,00 (3,33-50,55)	14,62 (6,25-60,55)	0,733	13,80 (6,42-25,85)	13,85 (5,34-21,68)	0,807
CD14+CD16+CD107a+_MFICD107a+	639,00 (552,50-711,50)	726,00 (564,25-1191,00)	0,188	632,00 (596,25-761,75)	664,00 (624,50-1025,75)	0,429
CD14+CD16+CTLA4+	6,02 (1,54-10,72)	9,04 (6,13-15,98)	0,071	6,52 (4,46-14,03)	7,79 (4,49-14,40)	0,625
CD14+CD16+CTLA4+_MFICTLA4+	315,50 (299,50-341,75)	333,00 (310,50-359,50)	0,396	334,50 (291,75-364,75)	353,50 (325,25-396,00)	0,349
CD14+CD16+Nkp44+	65,80 (42,70-81,05)	62,70 (46,93-80,45)	0,845	39,20 (27,75-51,65)	44,90 (19,50-57,98)	0,845
CD14+CD16+Nkp44+_MFINKp44+	723,00 (573,50-873,50)	602,50 (569,50-750,75)	0,558	647,00 (580,00-842,00)	670,00 (499,25-847,50)	0,591
CD14+CD16+CD69+	64,00 (39,40-88,20)	68,15 (28,70-79,80)	0,864	34,50 (21,75-47,60)	35,55 (15,23-51,50)	0,884
CD14+CD16+CD69+_MFICD69+	2959,00 (2314,00-3728,00)	2485,00 (1658,25-3222,75)	0,272	2763,00 (2358,00-3648,00)	1960,00 (1551,25-2778,25)	0,054
CD14+CD16+NKG2D+	33,80 (6,32-46,20)	23,25 (16,03-58,08)	0,495	17,70 (13,60-31,50)	24,40 (16,78-34,65)	0,306
CD14+CD16+NKG2D+_MFINKG2D+	352,00 (324,00-381,50)	373,00 (327,50-397,50)	0,354	359,00 (338,50-379,50)	411,00 (350,50-548,00)	0,217
CD14+CD16+PD1+	57,90 (38,85-84,55)	59,00 (41,18-78,80)	0,770	38,80 (31,70-54,95)	29,70 (21,40-64,18)	0,317
CD14+CD16+PD1+_MFIPD1+	846,00 (627,00-1113,50)	677,50 (568,25-1201,00)	0,884	680,00 (647,50-1049,00)	609,00 (496,00-849,00)	0,222

TABLA 2	PRE TRATAMIENTO			POST TRATAMIENTO		
Células T	CPR (Q1-Q3)	NO-CPR (Q1-Q3)	P-VALOR	CPR (Q1-Q3)	NO-CPR (Q1-Q3)	P-VALOR
CD3+CD56-CD16+	59,90 (46,65-68,05)	64,00 (49,05-67,38)	0,643	43,30 (35,80-63,45)	55,80 (39,35-69,15)	0,380
CD3+CD56-CD16+_MFICD16+	459,00 (387,00-557,00)	492,00 (437,75-541,00)	0,329	401,00 (346,00-490,50)	427,00 (368,25-525,50)	0,479
CD3+CD56-CD107a+	0,11 (0,06-0,32)	0,14 (0,06-0,36)	0,751	0,04 (0,03-0,12)	0,07 (0,04-0,11)	0,494
CD3+CD56-CD107a+_MFICD107a+	550,00 (504,50-630,50)	492,50 (468,50-788,25)	0,435	506,00 (478,50-593,00)	467,00 (453,75-496,75)	0,040
CD3+CD56-CTLA4+	0,10 (0,07-0,29)	0,21 (0,14-0,53)	0,113	0,10 (0,06-0,14)	0,11 (0,05-0,13)	0,883
CD3+CD56-CTLA4+_MFICTLA4+	249,00 (235,00-261,00)	243,00 (239,75-255,25)	0,608	245,00 (233,00-253,00)	236,50 (229,50-257,75)	0,435
CD3+CD56-NKp44+	0,16 (0,07-0,38)	0,21 (0,10-0,44)	0,826	0,08 (0,05-0,11)	0,08 (0,07-0,13)	0,591
CD3+CD56-NKp44+_MFINKp44+	376,00 (354,00-445,00)	386,50 (349,75-451,00)	0,751	370,00 (341,00-392,00)	393,50 (367,50-423,75)	0,079
CD3+CD56-CD69+	1,76 (1,12-2,90)	2,05 (1,42-3,57)	0,464	1,31 (1,08-2,80)	1,86 (0,98-2,37)	0,807
CD3+CD56-CD69+_MFICD69+	575,00 (523,50-699,00)	527,50 (500,75-568,75)	0,172	584,00 (549,50-618,00)	616,50 (543,75-664,75)	0,575
CD3+CD56-NKG2D+	23,20 (21,45-26,10)	21,95 (17,85-32,35)	0,661	20,90 (19,35-25,45)	23,45 (16,40-25,38)	0,961
CD3+CD56-NKG2D+_MFINKG2D+	535,00 (490,00-592,00)	453,00 (341,75-542,50)	0,057	447,00 (395,00-681,50)	479,00 (363,00-619,75)	0,575
CD3+CD56-PD1+	6,94 (1,39-13,75)	3,50 (0,44-7,31)	0,294	0,13 (0,06-0,50)	0,23 (0,09-0,45)	0,733
CD3+CD56-PD1+_MFIPD1+	412,00 (368,00-438,00)	397,00 (365,00-426,75)	0,643	333,00 (324,50-343,50)	342,50 (326,00-369,00)	0,660
Células T	CPR (Q1-Q3)	NO-CPR (Q1-Q3)	P-VALOR	CPR (Q1-Q3)	NO-CPR (Q1-Q3)	P-VALOR
CD3+	67,40 (57,95-72,00)	58,45 (52,40-74,03)	0,845	68,50 (56,90-71,80)	67,25 (55,30-74,30)	0,922
CD3+NKG2D+PD1+	1,80 (0,56-4,56)	1,85 (0,17-3,24)	0,354	0,08 (0,02-0,25)	0,15 (0,02-0,33)	0,661
CD3+NKG2D+PD1+_MFINKG2D+	564,00 (502,00-658,50)	425,50 (355,25-494,75)	0,013	415,00 (347,50-525,00)	420,50 (350,25-520,75)	0,961
CD3+NKG2D+PD1+_MFIPD1+	400,00 (357,50-457,00)	407,50 (353,50-431,75)	0,826	341,00 (332,50-355,50)	341,50 (324,75-387,25)	0,826
CD3+NKG2D+PD1-	22,20 (17,35-23,55)	19,95 (15,05-23,83)	0,435	19,40 (16,65-22,30)	18,40 (13,13-19,78)	0,421
CD3+NKG2D+PD1-_MFINKG2D+	529,00 (455,00-603,50)	447,50 (338,75-539,50)	0,083	436,00 (367,50-673,00)	456,00 (359,00-619,25)	0,714
CD3+NKG2D-PD1+	4,46 (0,76-7,24)	1,61 (0,24-2,75)	0,157	0,09 (0,05-0,30)	0,11 (0,06-0,21)	0,942
CD3+NKG2D-PD1+_MFIPD1+	405,00 (359,50-426,00)	396,00 (360,25-430,25)	0,788	326,00 (316,00-348,00)	364,50 (331,00-393,75)	0,057
Células T CD4	CPR (Q1-Q3)	NO-CPR (Q1-Q3)	P-VALOR	CPR (Q1-Q3)	NO-CPR (Q1-Q3)	P-VALOR
CD3+CD4+	48,40 (44,20-55,85)	52,05 (44,85-55,70)	0,696	49,70 (41,35-57,40)	47,80 (44,68-53,35)	0,884
CD3+CD4+CD25+	19,40 (16,35-21,55)	14,65 (12,95-21,53)	0,294	18,80 (12,30-23,45)	19,00 (17,50-20,33)	0,845
CD3+CD4+CD25+_MFICD25+	438,00 (416,50-470,50)	415,50 (410,50-437,25)	0,102	441,00 (439,00-469,00)	428,00 (420,00-443,50)	0,051
CD3+CD4+Treg	3,25 (1,91-4,39)	2,14 (1,72-2,86)	0,157	3,50 (2,22-4,16)	2,98 (1,96-3,65)	0,329
CD3+CD4+Treg_MFICD25+	1157,00 (1141,00-1248,50)	1059,00 (1049,25-1160,25)	0,023	1209,00 (1144,50-1245,00)	1162,00 (1100,25-1232,00)	0,625
CD3+CD4+CTLA4+	0,26 (0,23-0,39)	0,27 (0,17-0,50)	0,981	0,20 (0,15-0,30)	0,24 (0,21-0,38)	0,282
CD3+CD4+CTLA4+_MFICTLA4+	200,00 (196,00-203,00)	198,00 (193,50-208,00)	0,678	197,00 (195,00-200,50)	197,00 (200,00-200,75)	0,883
CD3+CD4+CD69+	2,21 (0,96-3,00)	1,87 (1,07-2,42)	0,733	1,11 (0,84-1,45)	0,92 (0,67-1,82)	0,733
CD3+CD4+CD69+_MFICD69+	437,00 (424,50-476,00)	439,00 (420,00-471,00)	0,714	453,00 (435,50-475,00)	476,00 (436,50-491,25)	0,341
CD3+CD4+NKG2D+	1,94 (1,42-2,68)	2,56 (1,35-4,31)	0,661	1,23 (0,58-4,76)	2,51 (1,50-4,61)	0,380
CD3+CD4+NKG2D+_MFINKG2D+	346,00 (303,50-400,00)	322,00 (283,25-353,00)	0,329	327,00 (301,00-450,00)	276,00 (254,50-325,00)	0,017
CD3+CD4+PD1+	8,31 (1,70-15,30)	2,12 (0,34-4,57)	0,045	0,13 (0,08-0,33)	0,12 (0,07-0,25)	0,494
CD3+CD4+PD1+_MFIPD1+	422,00 (370,50-448,50)	397,00 (370,25-440,25)	0,591	351,00 (337,50-380,00)	353,00 (346,75-382,00)	0,625
CD3+CD4+NKG2D+PD1+	0,23 (0,07-0,27)	0,09 (0,03-0,27)	0,526	0,02 (0,00-0,03)	0,02 (0,01-0,06)	0,574
CD3+CD4+NKG2D+PD1+_MFINKG2D+	320,00 (273,75-362,25)	326,50 (254,25-398,25)	0,877	309,00 (252,25-384,00)	273,00 (250,75-419,25)	0,884
CD3+CD4+NKG2D+PD1+_MFIPD1+	410,00 (365,50-494,25)	404,00 (348,75-478,25)	0,837	366,00 (347,50-434,25)	370,00 (335,25-398,50)	0,619
CD3+CD4+NKG2D+PD1-	1,58 (1,08-1,99)	1,86 (1,04-3,09)	0,643	0,82 (0,43-3,55)	1,74 (1,17-3,19)	0,367
CD3+CD4+NKG2D+PD1-_MFINKG2D+	361,00 (284,00-404,00)	320,50 (279,75-353,00)	0,449	322,00 (279,50-426,00)	263,50 (253,25-317,00)	0,019
CD3+CD4+PD1+NKG2D-	6,12 (1,18-10,37)	1,48 (0,24-2,33)	0,045	0,10 (0,05-0,23)	0,07 (0,04-0,13)	0,366
CD3+CD4+PD1+NKG2D-_MFIPD1+	419,00 (367,50-447,50)	401,50 (368,50-426,25)	0,449	345,00 (333,50-371,50)	367,50 (345,00-409,25)	0,150
Células T CD8	CPR (Q1-Q3)	NO-CPR (Q1-Q3)	P-VALOR	CPR (Q1-Q3)	NO-CPR (Q1-Q3)	P-VALOR
CD3+CD8+	17,50 (11,70-25,55)	14,35 (13,10-20,98)	0,845	15,80 (12,70-25,70)	16,95 (13,48-24,33)	0,981
CD3+CD8+_MFICD8+	4832,00 (3721,50-6078,50)	4363,50 (3545,25-4765,75)	0,380	4845,00 (4546,50-6156,50)	5093,50 (4108,00-5613,75)	0,306
CD3+CD4+CD8+	5,17 (3,15-8,23)	6,60 (5,27-12,70)	0,262	6,10 (2,36-8,44)	6,79 (3,29-12,68)	0,407
CD3+CD4+CD8d	1,28 (0,71-1,69)	1,32 (1,12-1,71)	0,807	1,15 (0,44-1,50)	1,05 (0,66-1,55)	0,845
CD3+CD8+CD25+	5,57 (4,02-6,42)	4,42 (2,91-8,30)	0,643	5,75 (3,39-8,09)	5,22 (3,78-7,68)	0,864
CD3+CD8+CD25+_MFICD25+	533,00 (524,50-543,50)	535,00 (524,50-538,75)	0,981	535,00 (531,50-544,50)	527,00 (513,50-534,25)	0,195
CD3+CD8+CTLA4+	0,19 (0,10-0,23)	0,32 (0,11-0,43)	0,143	0,14 (0,13-0,23)	0,20 (0,15-0,29)	0,156
CD3+CD8+CTLA4+_MFICTLA4+	205,00 (197,75-208,50)	203,00 (198,25-205,75)	0,588	202,00 (198,25-204,75)	205,00 (198,00-210,25)	0,455
CD3+CD8+CD69+	2,95 (2,15-3,90)	3,21 (1,62-3,91)	0,845	2,63 (2,23-3,27)	4,06 (1,67-5,48)	0,643
CD3+CD8+CD69+_MFICD69+	570,00 (502,00-701,00)	554,00 (529,00-645,50)	0,961	631,00 (545,00-731,00)	628,50 (552,50-764,00)	0,922
CD3+CD8+CD69+_MFICD8+	4314,00 (3276,00-5014,50)	4088,00 (3211,50-4661,00)	0,643	4139,00 (3900,00-4961,50)	4164,50 (3133,75-5082,25)	0,407
CD3+CD8+CD69-	92,00 (88,10-93,05)	89,80 (88,28-92,40)	0,479	92,00 (89,95-92,65)	89,50 (87,95-91,03)	0,124
CD3+CD8+CD69-_MFICD8+	4845,00 (3835,50-6129,50)	4363,50 (3550,25-4772,75)	0,367	4845,00 (4584,50-6198,50)	5065,00 (4110,75-5684,50)	0,305
CD3+CD8+NKG2D+	88,20 (75,90-92,30)	73,90 (67,63-87,25)	0,075	78,50 (61,10-91,00)	74,10 (64,15-91,65)	0,922
CD3+CD8+NKG2D+_MFINKG2D+	568,00 (435,00-619,00)	409,50 (368,50-539,00)	0,051	469,00 (378,50-644,00)	451,00 (348,50-684,75)	0,884
CD3+CD8+NKG2D+_MFICD8+	4859,00 (3799,50-6154,50)	4375,00 (3649,75-4977,25)	0,464	5022,00 (4629,50-6293,50)	5214,00 (4265,00-5744,00)	0,329
CD3+CD8+NKG2D-	12,50 (8,17-24,65)	25,50 (13,05-32,88)	0,079	22,40 (9,40-39,00)	26,00 (8,06-36,88)	0,961
CD3+CD8+NKG2D-_MFICD8+	3809,00 (3277,00-4612,50)	4016,00 (3537,00-4374,00)	0,864	4314,00 (3863,00-5897,00)	4401,00 (3659,75-5206,00)	0,696
CD3+CD8+PD1+	4,05 (1,29-11,45)	1,66 (0,15-3,82)	0,102	0,16 (0,10-0,33)	0,19 (0,05-0,21)	0,591
CD3+CD8+PD1+_MFIPD1+	594,00 (560,75-645,25)	601,00 (526,00-658,00)	0,661	538,00 (504,50-557,50)	558,00 (531,50-603,50)	0,119
CD3+CD8+PD1+_MFICD8+	5099,50 (4682,25-6082,75)	5206,00 (3783,00-5767,00)	0,477	7604,00 (5946,50-8354,50)	6770,00 (5888,50-8369,00)	0,659
CD3+CD8+PD1-	87,10 (81,90-89,70)	88,05 (83,25-89,00)	0,903	88,90 (86,90-89,85)	87,05 (85,95-87,65)	0,137
CD3+CD8+PD1-_MFICD8+	4859,00 (3737,00-6163,00)	4417,50 (3586,75-4802,25)	0,393	4940,00 (4597,00-6259,50)	5199,50 (4202,25-5703,75)	0,306
CD3+CD8+NKG2D+PD1+	3,59 (1,17-9,21)	1,58 (0,09-3,40)	0,067	0,13 (0,09-0,27)	0,13 (0,02-0,21)	0,435
CD3+CD8+NKG2D+PD1+_MFINKG2D+	656,50 (553,00-773,75)	495,00 (429,50-512,00)	0,043	419,00 (359,50-832,00)	519,00 (369,00-926,00)	0,835
CD3+CD8+NKG2D+PD1+_MFIPD1+	591,50 (561,00-649,00)	594,00 (526,00-663,50)	0,681	542,00 (504,50-560,50)	556,00 (538,00-621,00)	0,136
CD3+CD8+NKG2D+PD1-	74,20 (68,85-79,85)	64,75 (57,08-77,05)	0,164	68,90 (54,55-82,55)	64,30 (55,28-79,55)	0,733
CD3+CD8+NKG2D+PD1-_MFINKG2D+	558,00 (434,50-620,50)	410,50 (369,00-539,00)	0,051	471,00 (377,50-646,50)	449,00 (348,00-692,25)	0,922
CD3+CD8+PD1+NKG2D-	0,23 (0,09-0,95)	0,11 (0,02-0,90)	0,365	0,03 (0,00-0,05)	0,01 (0,00-0,04)	0,762
CD3+CD8+PD1+NKG2D-_MFIPD1+	591,00 (522,00-658,00)	567,00 (532,00-621,00)	0,789	519,00 (496,00-529,00)	558,00 (518,50-577,50)	0,458

TABLA 3	PRE TRATAMIENTO			POST TRATAMIENTO		
Células T CD56+	CPR (Q1-Q3)	NO-CPR (Q1-Q3)	P-VALOR	CPR (Q1-Q3)	NO-CPR (Q1-Q3)	P-VALOR
CD3+_MFICD56+	66,70 (58,25-72,40)	61,45 (56,23-67,30)	0,407	66,00 (61,35-72,10)	60,15 (58,03-63,55)	0,124
CD3+CD56+	4,40 (1,37-7,80)	2,03 (1,60-2,67)	0,306	4,56 (2,35-10,55)	2,07 (1,32-3,14)	0,092
CD3+CD56+MFICD56	491,00 (414,00-611,00)	374,00 (319,00-407,50)	0,003	437,00 (415,50-668,00)	397,00 (368,25-462,50)	0,060
CD3+CD56+CD16+	6,84 (2,11-10,71)	2,57 (1,55-3,24)	0,097	5,21 (3,15-13,60)	2,68 (1,17-3,79)	0,088
CD3+CD56+CD16+_MFICD56+	554,00 (490,00-636,00)	443,50 (409,75-497,00)	0,003	535,00 (502,50-694,00)	487,50 (441,75-539,75)	0,092
CD3+CD56+CD16+_MFICD16+	567,00 (448,50-770,50)	578,00 (548,25-613,75)	0,733	453,00 (355,50-601,00)	510,00 (397,25-616,25)	0,575
CD3+CD56+CD16-	0,93 (0,33-2,91)	0,47 (0,24-1,11)	0,341	2,13 (0,68-3,72)	0,58 (0,17-1,49)	0,051
CD3+CD56+CD16-_MFICD56+	535,00 (511,00-611,50)	454,50 (401,75-505,00)	0,014	559,00 (493,00-678,00)	495,00 (454,50-553,00)	0,153
CD3+CD56+CD107a+	0,01 (0,00-0,01)	0,00 (0,00-0,01)	0,308	0,00 (0,00-0,02)	0,00 (0,00-0,01)	0,279
CD3+CD56+CD107a+_MFICD107a+	491,00 (452,50-560,00)	819,00 (457,00-919,00)	0,297	542,00 (432,00-581,00)	575,00 (514,00-849,50)	0,405
CD3+CD56+CD107a+_MFICD56+	438,00 (362,50-561,50)	389,00 (368,00-428,00)	0,342	447,00 (348,00-630,00)	510,00 (379,00-626,50)	0,905
CD3+CD56+CD107a-	7,32 (2,54-12,98)	3,35 (2,11-4,45)	0,097	8,26 (4,28-15,35)	4,03 (2,46-5,10)	0,051
CD3+CD56+CD107a-_MFICD56+	550,00 (477,00-626,00)	473,00 (404,00-491,75)	0,022	506,00 (485,50-652,00)	485,00 (441,75-522,25)	0,118
CD3+CD56+CTLA4+	0,01 (0,00-0,02)	0,01 (0,00-0,02)	0,489	0,01 (0,00-0,02)	0,01 (0,00-0,01)	0,557
CD3+CD56+CTLA4+_MFICTLA4+	223,00 (216,75-237,50)	274,00 (248,00-313,00)	0,011	245,00 (220,00-275,00)	226,00 (220,00-271,00)	0,841
CD3+CD56+CTLA4+_MFICD56+	630,00 (435,00-946,75)	475,00 (415,00-646,00)	0,253	434,00 (352,00-609,00)	381,00 (375,00-462,00)	0,442
CD3+CD56+CTLA4-	5,69 (2,37-10,30)	2,54 (1,74-3,61)	0,079	6,77 (3,55-12,55)	3,23 (1,92-4,25)	0,036
CD3+CD56+CTLA4-_MFICD56+	565,00 (488,00-631,50)	491,50 (427,00-510,75)	0,040	542,00 (510,00-660,50)	505,00 (447,50-531,25)	0,043
CD3+CD56+Nkp44+	0,02 (0,00-0,04)	0,01 (0,01-0,04)	0,751	0,02 (0,01-0,03)	0,01 (0,01-0,04)	0,826
CD3+CD56+Nkp44+_MFINKp44+	364,50 (338,00-459,50)	402,00 (365,50-494,00)	0,103	345,00 (335,00-433,50)	383,00 (348,50-460,00)	0,222
CD3+CD56+Nkp44+_MFICD56+	602,50 (390,00-762,25)	407,00 (384,50-664,00)	0,580	519,00 (395,50-807,50)	379,00 (372,00-839,00)	0,697
CD3+CD56+Nkp44-	5,72 (2,14-9,70)	2,36 (1,67-3,47)	0,083	6,04 (3,53-11,58)	3,03 (1,76-4,15)	0,051
CD3+CD56+Nkp44-_MFICD56+	562,00 (478,00-624,50)	471,00 (411,25-500,50)	0,023	519,00 (503,50-654,50)	489,00 (436,00-533,50)	0,075
CD3+CD56+CD69+	0,42 (0,25-0,80)	0,31 (0,14-0,64)	0,494	0,55 (0,34-0,76)	0,36 (0,12-0,66)	0,222
CD3+CD56+CD69+_MFICD69+	743,00 (536,50-1049,50)	718,00 (663,50-1064,25)	0,661	967,00 (579,50-1155,50)	957,00 (836,25-1136,00)	0,696
CD3+CD56+CD69+_MFICD56+	548,00 (497,00-636,50)	449,00 (435,00-511,00)	0,048	612,00 (489,00-652,50)	477,50 (424,00-601,25)	0,083
CD3+CD56+CD69-	7,13 (2,25-12,41)	3,10 (1,85-3,87)	0,113	7,76 (3,93-15,35)	3,55 (1,71-4,39)	0,036
CD3+CD56+CD69-_MFICD56+	528,00 (461,50-636,50)	422,00 (384,00-458,75)	0,002	498,00 (466,50-684,00)	445,50 (425,75-515,50)	0,040
CD3+CD56+NKG2D+	4,95 (2,08-8,41)	2,15 (1,40-3,02)	0,102	3,79 (2,64-7,80)	3,32 (0,89-4,03)	0,130
CD3+CD56+NKG2D+_MFINKG2D+	548,00 (464,50-650,00)	394,00 (346,25-455,00)	0,012	382,00 (360,50-632,50)	427,00 (324,25-542,75)	0,626
CD3+CD56+NKG2D+_MFICD56+	538,00 (487,00-632,50)	459,50 (409,50-496,00)	0,010	551,00 (503,50-635,50)	495,00 (447,00-545,75)	0,051
CD3+CD56+NKG2D-	1,19 (0,85-3,96)	1,00 (0,52-1,76)	0,542	2,92 (0,50-6,61)	0,78 (0,60-1,38)	0,223
CD3+CD56+NKG2D-_MFICD56+	530,00 (483,50-612,50)	457,50 (411,25-505,25)	0,036	502,00 (470,00-676,00)	457,50 (426,00-541,50)	0,113
CD3+CD56+PD1+	0,44 (0,15-0,82)	0,14 (0,02-0,33)	0,071	0,05 (0,02-0,09)	0,03 (0,01-0,04)	0,464
CD3+CD56+PD1+_MFIPD1+	372,00 (342,00-397,50)	387,50 (362,25-425,50)	0,232	331,00 (316,75-369,75)	386,50 (333,50-611,00)	0,150
CD3+CD56+PD1+_MFICD56+	523,00 (429,50-647,50)	378,00 (333,25-474,50)	0,028	614,00 (427,50-761,75)	455,50 (357,75-631,50)	0,198
CD3+CD56+PD1-	5,67 (2,38-9,38)	2,54 (1,73-3,47)	0,164	6,54 (3,84-12,35)	3,03 (1,89-3,82)	0,028
CD3+CD56+PD1-_MFICD56+	544,00 (482,50-641,00)	432,50 (401,75-471,50)	0,002	506,00 (485,50-686,50)	488,50 (434,25-528,25)	0,071
Células NK	CPR (Q1-Q3)	NO-CPR (Q1-Q3)	P-VALOR	CPR (Q1-Q3)	NO-CPR (Q1-Q3)	P-VALOR
CD3-CD56+	3,92 (1,69-8,60)	3,35 (1,73-9,39)	0,864	3,28 (2,37-4,81)	3,61 (1,33-4,81)	0,733
CD3-CD56+_MFICD56+	516,00 (475,00-656,00)	503,00 (425,50-580,50)	0,526	618,00 (525,00-805,50)	597,00 (479,25-694,25)	0,591
CD3-CD56+CD16+	92,50 (90,45-94,55)	91,55 (85,63-94,13)	0,305	93,00 (90,70-95,25)	94,50 (92,25-95,80)	0,479
CD3-CD56+CD16+_MFICD56+	515,00 (454,50-655,00)	498,50 (414,75-589,50)	0,558	609,00 (521,00-802,00)	582,00 (471,25-685,00)	0,526
CD3-CD56+CD16+_MFICD16+	1408,00 (1294,50-1621,00)	1203,00 (1078,25-1591,50)	0,180	1480,00 (1162,50-1694,50)	1212,50 (1066,75-1403,75)	0,064
CD3-CD56+CD16-	1,53 (0,82-2,45)	2,51 (1,10-3,43)	0,380	2,72 (1,49-3,93)	2,23 (0,90-4,00)	0,495
CD3-CD56+CD16-_MFICD56+	1196,00 (588,00-2003,00)	1233,00 (572,00-1537,50)	0,961	1727,00 (1363,00-2131,50)	1299,00 (856,00-2040,50)	0,392
CD3-CD56+CD107a+	0,69 (0,24-1,56)	0,64 (0,37-1,42)	0,922	0,25 (0,14-0,66)	0,25 (0,14-0,47)	0,608
CD3-CD56+CD107a+_MFICD107a+	322,00 (317,00-347,50)	339,50 (318,50-396,50)	0,464	326,00 (312,50-340,00)	318,00 (303,00-337,50)	0,243
CD3-CD56+CD107a+_MFICD56+	352,00 (256,00-554,50)	338,00 (289,50-433,00)	0,845	517,00 (343,00-701,50)	468,00 (324,50-624,50)	0,736
CD3-CD56+CD107a-	90,50 (87,00-93,00)	89,35 (86,65-92,23)	0,464	90,50 (88,45-92,80)	90,10 (89,40-92,33)	0,922
CD3-CD56+CD107a-_MFICD56+	517,00 (460,00-649,50)	505,50 (444,75-629,50)	0,608	624,00 (529,50-758,50)	569,50 (496,00-678,25)	0,510
CD3-CD56+CTLA4+	0,17 (0,13-0,64)	0,41 (0,30-1,14)	0,028	0,15 (0,12-0,28)	0,29 (0,17-0,37)	0,305
CD3-CD56+CTLA4+_MFICTLA4+	192,50 (185,75-215,50)	206,00 (192,50-230,25)	0,174	193,00 (187,50-198,00)	190,00 (187,50-195,50)	0,735
CD3-CD56+CTLA4+_MFICD56+	544,00 (275,25-628,75)	449,00 (289,50-580,50)	0,931	494,00 (364,00-719,00)	498,00 (314,50-610,50)	0,484
CD3-CD56+CTLA4-	74,20 (72,95-76,25)	72,80 (70,58-75,38)	0,179	73,20 (71,80-74,65)	74,10 (71,85-74,85)	0,807
CD3-CD56+CTLA4-_MFICD56+	517,00 (473,00-656,50)	502,50 (447,75-623,75)	0,626	628,00 (532,00-760,00)	576,00 (496,75-669,50)	0,510
CD3-CD56+Nkp44+	1,29 (0,30-3,76)	1,17 (0,61-2,00)	0,884	0,32 (0,17-1,26)	0,51 (0,30-2,58)	0,435
CD3-CD56+Nkp44+_MFINKp44+	300,00 (266,00-375,50)	282,00 (253,50-447,00)	0,864	278,00 (260,50-312,50)	318,50 (251,50-356,50)	0,494
CD3-CD56+Nkp44+_MFICD56+	293,00 (263,00-688,00)	484,00 (291,00-713,75)	0,251	1080,00 (446,50-1642,00)	914,50 (705,75-2249,00)	0,864
CD3-CD56+Nkp44-	74,40 (71,00-79,60)	71,70 (71,25-75,80)	0,449	74,10 (72,65-76,90)	72,45 (71,00-74,80)	0,329
CD3-CD56+Nkp44-_MFICD56+	532,00 (471,50-661,50)	510,00 (445,50-640,25)	0,643	630,00 (538,00-767,50)	553,50 (503,00-686,25)	0,393
CD3-CD56+CD69+	11,70 (6,29-20,15)	17,60 (12,53-41,03)	0,150	17,30 (12,05-25,00)	11,21 (6,47-25,15)	0,242
CD3-CD56+CD69+_MFICD69+	432,00 (423,50-549,00)	520,00 (463,50-616,75)	0,188	480,00 (452,50-530,50)	509,00 (469,50-553,00)	0,329
CD3-CD56+CD69+_MFICD56+	522,00 (425,00-659,50)	514,00 (378,50-585,00)	0,807	637,00 (533,50-767,50)	640,50 (510,75-675,75)	0,464
CD3-CD56+CD69-	83,80 (78,85-85,95)	76,60 (58,33-83,48)	0,097	78,00 (72,50-81,50)	81,05 (73,20-85,98)	0,305
CD3-CD56+CD69-_MFICD56+	517,00 (488,50-649,00)	500,00 (444,50-592,00)	0,558	606,00 (523,00-796,50)	580,50 (466,50-693,75)	0,558
CD3-CD56+NKG2D+	71,90 (64,15-87,30)	64,05 (55,73-73,23)	0,188	75,40 (45,80-83,50)	73,80 (45,20-86,75)	0,770
CD3-CD56+NKG2D+_MFINKG2D+	355,00 (317,50-492,00)	315,50 (288,25-378,75)	0,118	349,00 (270,00-451,50)	340,00 (271,00-428,25)	0,922
CD3-CD56+NKG2D+_MFICD56+	528,00 (494,50-675,50)	545,00 (431,25-620,00)	0,558	651,00 (569,50-869,50)	646,00 (502,00-753,75)	0,661
CD3-CD56+NKG2D-	27,10 (12,15-33,30)	31,75 (24,95-42,28)	0,196	24,40 (16,05-51,35)	25,10 (13,23-51,50)	0,845
CD3-CD56+NKG2D-_MFICD56+	467,00 (378,00-598,50)	456,50 (398,25-516,50)	0,661	522,00 (462,50-715,00)	524,50 (450,00-601,75)	0,421
CD3-CD56+PD1+	2,43 (0,82-3,90)	1,04 (0,46-2,68)	0,591	0,88 (0,16-1,41)	0,76 (0,41-2,21)	0,526
CD3-CD56+PD1+_MFIPD1+	288,00 (265,00-397,00)	273,00 (253,50-537,25)	0,845	254,00 (245,00-276,00)	262,50 (252,75-278,25)	0,435
CD3-CD56+PD1+_MFICD56+	426,00 (280,50-665,50)	351,00 (269,00-689,50)	0,864	538,00 (305,00-1002,50)	491,50 (382,75-620,00)	0,961
CD3-CD56+PD1-	75,40 (70,20-77,95)	75,00 (70,45-77,80)	0,733	74,90 (70,10-76,40)	74,10 (72,25-75,38)	0,751
CD3-CD56+PD1-_MFICD56+	522,00 (475,50-657,50)	519,50 (450,75-596,25)	0,626	621,00 (525,00-809,00)	616,00 (488,75-702,50)	0,678
CD3-CD56+NKG2D+PD1+	1,46 (0,59-2,66)	0,86 (0,49-2,04)	0,733	0,79 (0,16-1,58)	0,93 (0,49-2,53)	0,591
CD3-CD56+NKG2D+PD1+_MFINKG2D+	388,00 (276,00-537,50)	301,50 (265,75-362,75)	0,407	390,00 (269,50-557,00)	376,00 (347,00-476,00)	0,640
CD3-CD56+NKG2D+PD1+_MFIPD1+	242,00 (226,00-290,00)	231,00 (218,75-245,50)	0,379	226,00 (217,00-235,50)	230,00 (221,50-244,00)	0,323
CD3-CD56+NKG2D+PD1-	56,50 (50,70-65,15)	47,50 (40,10-57,73)	0,188	54,90 (36,05-61,35)	56,30 (37,48-65,40)	0,807
CD3-CD56+NKG2D+PD1-_MFINKG2D+	341,00 (303,50-479,50)	293,50 (268,75-365,75)	0,088	340,00 (254,50-442,00)	330,50 (252,50-419,25)	0,922
CD3-CD56+NKG2D+PD1-	0,63 (0,16-					



**Tablas 4, 5 y 6. Efecto del tratamiento neo-adyuvante en las poblaciones inmunitarias en sangre de la totalidad de los pacientes (TOTAL), en los pacientes con respuesta patológica completa (CPR) y pacientes con respuesta patológica no completa (no CPR).** Se indican las medianas de la variación en cada variable con sus intercuartiles (Q1 y Q3), así como el p-valor obtenido del análisis estadístico prueba de rangos con signo de Wilcoxon. Las variables representadas son porcentajes de células positivas para cada marcador y la intensidad de la señal (MFI) del marcador de interés.

TABLA 4		VARIACION POR TRATAMIENTO (POST/PRE)				
Células B	TOTAL (Q1-Q3)	P-VALOR TOTAL	CPR (Q1-Q3)	P-VALOR CPR	NO-CPR (Q1-Q3)	P-VALOR NO-CPR
CD3-CD19+	0,761 (0,407-1,299)	0,405	0,761 (0,639-1,453)	0,733	0,988 (0,381-1,229)	1,000
CD3-CD19+_MFICD19+	1,011 (0,905-1,223)	0,538	0,965 (0,914-1,169)	0,820	0,967 (0,781-1,232)	0,937
CD3-CD19+CD25+	1,105 (0,903-1,279)	0,270	0,990 (0,877-1,337)	1,000	1,112 (1,031-1,230)	0,239
CD3-CD19+CD25+_MFICD25+	1,026 (0,954-1,053)	0,721	0,992 (0,952-1,047)	1,000	1,034 (0,939-1,081)	0,844
CD3-CD19+CTLA4+	1,018 (0,411-1,750)	0,657	1,111 (0,556-1,707)	1,000	0,896 (0,327-2,083)	0,367
CD3-CD19+CTLA4+_MFICTLA4+	0,983 (0,864-1,063)	0,380	0,929 (0,891-1,055)	0,267	1,014 (0,878-1,092)	0,965
CD3-CD19+CD19hi	1,141 (0,821-2,082)	0,096	1,091 (0,809-1,488)	0,363	1,126 (0,846-1,627)	0,388
CD3-CD19+CD19hi_MFICD19+	1,004 (0,910-1,135)	0,564	1,015 (0,870-1,148)	0,507	0,988 (0,925-1,029)	0,433
CD3-CD19+CD19hiCD25+	1,037 (0,914-1,270)	0,406	1,016 (0,706-1,298)	0,865	1,101 (0,987-1,270)	0,328
CD3-CD19+CD19hiCD25+_MFICD25+	1,011 (0,876-1,226)	0,682	0,987 (0,882-1,242)	0,826	0,987 (0,848-1,196)	1,000
CD3-CD19+CD19hiCTLA4+	0,402 (0,063-0,819)	0,981	0,342 (0,000-0,462)	0,953	0,691 (0,189-1,367)	0,866
CD3-CD19+CD19hiCTLA4+_MFICTLA4+	0,982 (0,953-1,038)	0,866	0,968 (0,953-1,008)	0,593	1,030 (0,980-1,104)	0,593
Monocitos	TOTAL (Q1-Q3)	P-VALOR TOTAL	CPR (Q1-Q3)	P-VALOR CPR	NO-CPR (Q1-Q3)	P-VALOR NO-CPR
Clásicos	1,066 (0,986-1,360)	<b>0,005</b>	1,045 (0,967-1,377)	0,100	1,138 (1,003-1,334)	<b>0,019</b>
CD14++CD16-CD107a+	0,609 (0,533-1,567)	0,256	0,944 (0,402-1,868)	0,570	0,604 (0,575-1,497)	0,530
CD14++CD16-CD107a+_MFICD107a+	1,016 (0,940-1,042)	0,750	1,016 (0,990-1,039)	0,470	1,032 (0,907-1,057)	0,875
CD14++CD16-CTLA4+	0,833 (0,525-1,083)	<b>0,033</b>	0,910 (0,851-3,173)	0,712	0,552 (0,262-0,754)	<b>0,023</b>
CD14++CD16-CTLA4+_MFICTLA4+	1,029 (0,987-1,100)	<b>0,041</b>	1,037 (0,979-1,089)	0,379	1,041 (1,007-1,127)	<b>0,021</b>
CD14++CD16-NKp44+	0,955 (0,779-1,659)	0,770	1,114 (0,699-1,801)	0,691	0,850 (0,769-1,334)	0,209
CD14++CD16-NKp44+_MFINKp44+	0,979 (0,909-1,035)	0,092	0,980 (0,892-1,040)	0,394	0,959 (0,911-0,985)	<b>0,045</b>
CD14++CD16-CD69+	0,939 (0,573-1,976)	0,642	0,883 (0,513-1,620)	0,609	1,323 (0,538-2,193)	0,937
CD14++CD16-CD69+_MFICD69+	0,996 (0,894-1,062)	0,352	0,947 (0,891-1,033)	0,173	1,010 (0,915-1,085)	0,937
CD14++CD16-NKG2D+	1,065 (0,401-2,364)	0,804	1,019 (0,288-2,559)	0,955	1,292 (0,807-2,671)	0,638
CD14++CD16-NKG2D+_MFINKG2D+	1,003 (0,990-1,014)	0,675	1,003 (0,988-1,037)	0,550	1,003 (0,992-1,011)	0,878
CD14++CD16-PD1+	1,059 (0,678-1,518)	0,776	1,140 (0,755-1,477)	0,245	0,822 (0,601-1,245)	0,308
CD14++CD16-PD1+_MFIPD1+	0,979 (0,917-1,038)	0,160	0,986 (0,944-1,046)	0,495	0,939 (0,916-1,038)	0,099
Intermedios	0,669 (0,429-1,407)	0,436	0,783 (0,401-2,021)	0,955	0,678 (0,476-1,369)	0,308
CD14++CD16+CD107a+	0,421 (0,222-0,819)	<b>0,004</b>	0,311 (0,211-0,611)	<b>0,004</b>	0,615 (0,383-1,676)	0,388
CD14++CD16+CD107a+_MFICD107a+	0,928 (0,753-1,097)	0,328	0,916 (0,648-1,218)	0,331	0,894 (0,821-1,038)	0,508
CD14++CD16+CTLA4+	0,519 (0,221-1,604)	0,150	0,549 (0,324-1,083)	0,156	0,568 (0,090-3,289)	0,638
CD14++CD16+CTLA4+_MFICTLA4+	0,945 (0,749-1,016)	0,052	0,973 (0,723-1,084)	0,307	0,869 (0,741-0,993)	0,103
CD14++CD16+NKp44+	1,042 (0,684-1,538)	0,721	1,069 (0,640-1,371)	0,910	0,884 (0,671-1,359)	0,347
CD14++CD16+NKp44+_MFINKp44+	0,941 (0,759-1,025)	<b>0,006</b>	0,965 (0,807-1,038)	0,140	0,834 (0,678-0,949)	<b>0,019</b>
CD14++CD16+CD69+	0,692 (0,510-1,259)	0,073	0,689 (0,449-0,826)	<b>0,015</b>	0,779 (0,565-2,115)	0,695
CD14++CD16+CD69+_MFICD69+	0,942 (0,614-1,085)	<b>0,041</b>	0,679 (0,567-1,001)	0,088	0,989 (0,767-1,091)	0,308
CD14++CD16+NKG2D+	0,789 (0,436-2,150)	0,456	0,597 (0,427-1,382)	0,125	1,550 (0,399-2,586)	0,937
CD14++CD16+NKG2D+_MFINKG2D+	1,009 (0,888-1,096)	0,733	1,006 (0,897-1,029)	0,594	0,997 (0,808-1,110)	0,530
CD14++CD16+PD1+	0,862 (0,642-1,272)	0,510	1,004 (0,586-1,484)	0,733	0,830 (0,659-1,088)	0,182
CD14++CD16+PD1+_MFIPD1+	0,880 (0,742-1,056)	<b>0,009</b>	0,809 (0,708-1,030)	<b>0,020</b>	0,902 (0,796-1,045)	0,136
No-clásicos	0,369 (0,202-0,703)	<b>0,000</b>	0,369 (0,187-0,541)	<b>0,012</b>	0,318 (0,180-0,854)	<b>0,011</b>
CD14+CD16+CD107a+	0,984 (0,256-2,005)	0,496	0,915 (0,241-3,545)	0,496	0,773 (0,304-1,663)	0,530
CD14+CD16+CD107a+_MFICD107a+	1,077 (0,838-1,187)	0,534	1,142 (0,917-1,361)	0,221	1,034 (0,799-1,129)	0,959
CD14+CD16+CTLA4+	0,960 (0,487-2,373)	0,787	1,392 (0,557-3,819)	0,427	0,626 (0,252-2,308)	0,695
CD14+CD16+CTLA4+_MFICTLA4+	1,000 (0,923-1,188)	0,236	1,000 (0,923-1,188)	0,286	1,036 (0,969-1,229)	0,508
CD14+CD16+NKp44+	0,671 (0,447-0,956)	<b>0,005</b>	0,659 (0,450-0,959)	<b>0,036</b>	0,651 (0,400-0,942)	0,084
CD14+CD16+NKp44+_MFINKp44+	1,025 (0,820-1,315)	0,681	1,089 (0,908-1,302)	0,394	0,882 (0,795-1,216)	0,556
CD14+CD16+CD69+	0,694 (0,435-1,072)	<b>0,004</b>	0,666 (0,420-0,957)	<b>0,012</b>	0,613 (0,369-1,076)	0,099
CD14+CD16+CD69+_MFICD69+	0,829 (0,610-1,209)	0,139	0,967 (0,627-1,163)	0,532	0,732 (0,599-1,244)	0,158
CD14+CD16+NKG2D+	1,074 (0,577-2,185)	0,642	0,949 (0,524-2,319)	0,532	1,061 (0,492-2,058)	0,754
CD14+CD16+NKG2D+_MFINKG2D+	1,092 (0,949-1,368)	0,078	1,080 (0,950-1,169)	0,233	1,094 (0,939-1,483)	0,347
CD14+CD16+PD1+	0,795 (0,516-0,999)	<b>0,007</b>	0,931 (0,627-0,986)	<b>0,048</b>	0,607 (0,421-0,849)	0,084
CD14+CD16+PD1+_MFIPD1+	0,969 (0,618-1,305)	0,581	1,057 (0,697-1,452)	0,776	0,869 (0,539-1,204)	0,308

TABLA 5		VARIACION POR TRATAMIENTO (POST/PRE)				
Células T	TOTAL (Q1-Q3)	P-VALOR TOTAL	CPR (Q1-Q3)	P-VALOR CPR	NO-CPR (Q1-Q3)	P-VALOR NO-CPR
CD3+CD56-CD16+	0,866 (0,713-1,073)	<b>0,015</b>	0,866 (0,705-1,068)	<b>0,047</b>	0,981 (0,764-1,073)	0,388
CD3+CD56-CD16+_MFICD16+	0,867 (0,760-0,985)	<b>0,011</b>	0,877 (0,748-1,037)	0,125	0,860 (0,789-0,965)	0,060
CD3+CD56-CD107a+	0,481 (0,328-0,772)	<b>0,006</b>	0,481 (0,345-0,730)	<b>0,011</b>	0,460 (0,283-0,800)	0,100
CD3+CD56-CD107a+_MFICD107a+	0,994 (0,865-1,051)	0,206	0,978 (0,892-1,052)	0,609	0,995 (0,718-1,051)	0,308
CD3+CD56-CTLA4+	0,688 (0,229-0,955)	<b>0,013</b>	0,906 (0,546-1,424)	0,307	0,354 (0,203-0,699)	<b>0,028</b>
CD3+CD56-CTLA4+_MFICTLA4+	0,992 (0,938-1,039)	0,716	1,015 (0,937-1,046)	0,865	0,972 (0,936-1,057)	0,638
CD3+CD56-NKp44+	0,571 (0,288-0,983)	<b>0,011</b>	0,571 (0,378-0,824)	<b>0,023</b>	0,506 (0,162-1,202)	0,136
CD3+CD56-NKp44+_MFINKp44+	1,003 (0,874-1,071)	0,697	0,959 (0,792-1,021)	0,112	1,054 (0,989-1,076)	0,289
CD3+CD56-CD69+	0,947 (0,546-1,202)	0,194	0,947 (0,623-1,100)	0,244	0,891 (0,557-1,566)	0,480
CD3+CD56-CD69+_MFICD69+	1,057 (0,959-1,152)	0,141	1,034 (0,898-1,125)	0,820	1,072 (1,033-1,231)	<b>0,045</b>
CD3+CD56-NKG2D+	0,957 (0,769-1,092)	0,117	0,957 (0,788-1,075)	0,495	0,902 (0,740-1,133)	0,272
CD3+CD56-NKG2D+_MFINKG2D+	0,909 (0,818-1,168)	0,787	0,880 (0,788-1,073)	0,363	1,041 (0,844-1,388)	0,433
CD3+CD56-PD1+	0,049 (0,020-0,122)	<b>0,000</b>	0,043 (0,019-0,112)	<b>0,001</b>	0,094 (0,047-0,135)	<b>0,006</b>
CD3+CD56-PD1+_MFIPD1+	0,835 (0,749-1,000)	<b>0,001</b>	0,824 (0,749-0,973)	<b>0,005</b>	0,873 (0,771-1,033)	0,091
Células T (pueden ser CD56+ o CD56-)	TOTAL (Q1-Q3)	P-VALOR TOTAL	CPR (Q1-Q3)	P-VALOR CPR	NO-CPR (Q1-Q3)	P-VALOR NO-CPR
CD3+	0,999 (0,883-1,117)	0,754	1,020 (0,901-1,160)	0,532	0,996 (0,824-1,108)	0,814
CD3+NKG2D+PD1+	0,064 (0,027-0,168)	<b>0,000</b>	0,046 (0,022-0,112)	<b>0,002</b>	0,142 (0,047-0,202)	<b>0,008</b>
CD3+NKG2D+PD1+_MFINKG2D+	0,919 (0,707-1,126)	0,256	0,784 (0,605-0,954)	0,112	1,037 (0,909-1,184)	0,388
CD3+NKG2D+PD1+_MFIPD1+	0,876 (0,764-1,062)	<b>0,010</b>	0,854 (0,744-1,021)	<b>0,020</b>	0,920 (0,783-1,110)	0,347
CD3+NKG2D+PD1-	0,947 (0,738-1,079)	0,133	0,954 (0,733-1,153)	0,378	0,881 (0,758-1,007)	0,117
CD3+NKG2D+PD1-_MFINKG2D+	0,905 (0,810-1,162)	0,787	0,886 (0,769-1,074)	0,426	1,030 (0,828-1,394)	0,530
CD3+NKG2D-PD1+	0,057 (0,028-0,113)	<b>0,000</b>	0,043 (0,025-0,115)	<b>0,001</b>	0,089 (0,046-0,132)	<b>0,003</b>
CD3+NKG2D-PD1+_MFIPD1+	0,869 (0,772-1,043)	<b>0,008</b>	0,833 (0,760-1,000)	<b>0,021</b>	0,935 (0,804-1,063)	0,272
Células T CD4	TOTAL (Q1-Q3)	P-VALOR TOTAL	CPR (Q1-Q3)	P-VALOR CPR	NO-CPR (Q1-Q3)	P-VALOR NO-CPR
CD3+CD4+	0,973 (0,936-1,019)	0,269	0,973 (0,930-1,011)	0,331	0,955 (0,923-1,004)	0,239
CD3+CD4+CD25+	1,036 (0,886-1,214)	0,776	1,050 (0,916-1,103)	0,975	0,952 (0,771-1,447)	0,937
CD3+CD4+CD25+_MFICD25+	1,033 (0,971-1,078)	0,107	1,033 (0,981-1,065)	0,173	1,035 (0,970-1,086)	0,346
CD3+CD4+Treg	1,007 (0,757-1,619)	0,399	1,007 (0,784-1,424)	0,650	1,113 (0,729-1,785)	0,638
CD3+CD4+Treg_MFICD25+	1,042 (0,962-1,099)	<b>0,031</b>	1,005 (0,962-1,070)	0,427	1,090 (1,021-1,172)	<b>0,031</b>
CD3+CD4+CTLA4+	0,800 (0,625-1,338)	0,150	0,800 (0,639-1,064)	0,201	0,793 (0,609-1,649)	0,555
CD3+CD4+CTLA4+_MFICTLA4+	0,985 (0,947-1,021)	0,227	0,990 (0,953-1,020)	0,551	0,978 (0,946-1,009)	0,230
CD3+CD4+CD69+	0,552 (0,324-1,081)	<b>0,008</b>	0,500 (0,413-0,987)	<b>0,029</b>	0,800 (0,308-1,343)	0,308
CD3+CD4+CD69+_MFICD69+	1,026 (0,967-1,128)	0,157	0,998 (0,967-1,090)	0,733	1,069 (0,973-1,160)	0,099
CD3+CD4+NKG2D+	0,727 (0,432-1,711)	0,443	0,634 (0,424-1,238)	0,609	0,833 (0,512-1,991)	0,875
CD3+CD4+NKG2D+_MFINKG2D+	0,900 (0,822-1,119)	0,214	0,909 (0,836-1,149)	0,755	0,869 (0,778-1,058)	0,182
CD3+CD4-PD1+	0,046 (0,016-0,127)	<b>0,000</b>	0,024 (0,013-0,081)	<b>0,001</b>	0,076 (0,042-0,183)	<b>0,003</b>
CD3+CD4+PD1+_MFIPD1+	0,867 (0,756-1,015)	<b>0,003</b>	0,834 (0,762-0,965)	<b>0,015</b>	0,889 (0,770-1,025)	0,099
CD3+CD4+NKG2D+PD1+	0,109 (0,048-0,264)	<b>0,000</b>	0,070 (0,032-0,117)	<b>0,002</b>	0,287 (0,088-0,601)	<b>0,013</b>
CD3+CD4+NKG2D+PD1+_MFINKG2D+	0,954 (0,677-1,099)	0,427	0,985 (0,667-1,067)	0,917	0,875 (0,751-1,135)	0,575
CD3+CD4+NKG2D+PD1+_MFIPD1+	0,961 (0,764-1,107)	0,300	0,866 (0,764-1,107)	0,382	0,918 (0,770-1,054)	0,508
CD3+CD4+NKG2D+PD1-	0,672 (0,477-1,585)	0,443	0,623 (0,447-1,427)	0,650	0,763 (0,560-2,068)	0,875
CD3+CD4+NKG2D+PD1-_MFINKG2D+	0,899 (0,775-1,114)	0,214	0,899 (0,780-1,163)	0,755	0,858 (0,768-1,047)	0,182
CD3+CD4+PD1+NKG2D-	0,034 (0,018-0,099)	<b>0,000</b>	0,021 (0,013-0,073)	<b>0,001</b>	0,078 (0,030-0,172)	<b>0,004</b>
CD3+CD4+PD1+NKG2D-_MFIPD1+	0,869 (0,768-1,025)	<b>0,011</b>	0,825 (0,770-0,926)	<b>0,015</b>	0,977 (0,824-1,085)	0,530
Células T CD8	TOTAL (Q1-Q3)	P-VALOR TOTAL	CPR (Q1-Q3)	P-VALOR CPR	NO-CPR (Q1-Q3)	P-VALOR NO-CPR
CD3+CD8+	1,068 (0,889-1,212)	0,280	1,069 (0,901-1,242)	0,280	1,081 (0,963-1,236)	0,347
CD3+CD8+_MFICD8+	1,142 (1,011-1,214)	<b>0,000</b>	1,142 (1,007-1,225)	<b>0,041</b>	1,142 (1,048-1,167)	<b>0,006</b>
CD3+CD4+CD8+	0,797 (0,600-1,130)	0,347	0,980 (0,509-1,175)	0,865	0,734 (0,605-1,284)	0,530
CD3+CD4+CD8d	0,787 (0,621-1,105)	0,084	0,827 (0,637-1,054)	0,233	0,869 (0,604-1,157)	0,388
CD3+CD8+CD25+	0,996 (0,576-1,376)	0,837	0,948 (0,720-1,326)	0,955	1,030 (0,475-1,488)	0,937
CD3+CD8+CD25+_MFICD25+	0,988 (0,959-1,025)	0,347	0,988 (0,968-1,035)	0,955	0,984 (0,945-1,009)	0,224
CD3+CD8+CTLA4+	0,884 (0,565-1,258)	0,289	0,831 (0,590-1,253)	0,670	1,000 (0,540-1,340)	0,388
CD3+CD8+CTLA4+_MFICTLA4+	1,005 (0,963-1,062)	0,943	1,005 (0,966-1,030)	0,753	1,010 (0,961-1,077)	0,638
CD3+CD8+CD69+	1,149 (0,594-1,476)	0,897	1,149 (0,677-1,268)	0,733	1,213 (0,590-1,717)	0,530
CD3+CD8+CD69+_MFICD69+	1,132 (1,032-1,181)	<b>0,002</b>	1,063 (1,010-1,159)	0,069	1,143 (1,069-1,188)	<b>0,023</b>
CD3+CD8+CD69+_MFICD8+	1,083 (0,957-1,269)	0,117	0,989 (0,955-1,114)	0,650	1,094 (0,956-1,289)	0,209
CD3+CD8+CD69-	1,003 (0,972-1,029)	0,880	0,991 (0,982-1,029)	0,955	1,007 (0,971-1,026)	0,784
CD3+CD8+CD69-_MFICD8+	1,148 (1,022-1,210)	<b>0,001</b>	1,151 (1,011-1,220)	0,056	1,143 (1,043-1,168)	<b>0,006</b>
CD3+CD8+NKG2D+	0,897 (0,840-1,038)	<b>0,020</b>	0,890 (0,773-0,999)	<b>0,015</b>	0,973 (0,861-1,046)	0,480
CD3+CD8+NKG2D+_MFICD8+	1,133 (1,034-1,220)	<b>0,000</b>	1,155 (1,018-1,227)	<b>0,036</b>	1,125 (1,051-1,156)	<b>0,006</b>
CD3+CD8+NKG2D+_MFINKG2D+	0,943 (0,842-1,199)	0,658	0,890 (0,792-1,050)	0,233	0,989 (0,930-1,333)	0,530
CD3+CD8+NKG2D-	1,162 (0,944-1,681)	<b>0,017</b>	1,557 (1,013-2,090)	<b>0,017</b>	1,084 (0,901-1,219)	0,347
CD3+CD8+NKG2D-_MFICD8+	1,117 (0,986-1,237)	<b>0,002</b>	1,117 (0,982-1,236)	0,061	1,076 (0,987-1,162)	0,071
CD3+CD8+PD1+	0,070 (0,021-0,255)	<b>0,000</b>	0,032 (0,019-0,086)	<b>0,001</b>	0,165 (0,068-0,332)	<b>0,008</b>
CD3+CD8+PD1+_MFICD8+	1,516 (1,184-1,668)	<b>0,000</b>	1,473 (1,100-1,578)	<b>0,001</b>	1,515 (1,214-1,874)	<b>0,005</b>
CD3+CD8+PD1+_MFIPD1+	0,917 (0,822-1,033)	0,112	0,902 (0,845-0,988)	<b>0,022</b>	0,942 (0,822-1,209)	0,878
CD3+CD8+PD1-	1,014 (0,982-1,059)	<b>0,043</b>	1,014 (1,002-1,070)	<b>0,036</b>	1,016 (0,971-1,036)	0,695
CD3+CD8+PD1-_MFICD8+	1,151 (1,017-1,213)	<b>0,000</b>	1,148 (1,017-1,237)	<b>0,041</b>	1,144 (1,054-1,172)	<b>0,005</b>
CD3+CD8+NKG2D+PD1+	0,089 (0,019-0,231)	<b>0,000</b>	0,034 (0,019-0,092)	<b>0,001</b>	0,179 (0,084-0,385)	<b>0,010</b>
CD3+CD8+NKG2D+PD1+_MFINKG2D+	0,890 (0,664-1,186)	0,600	0,759 (0,567-0,984)	0,683	1,186 (0,890-1,604)	0,139
CD3+CD8+NKG2D+PD1+_MFIPD1+	0,928 (0,798-1,049)	0,122	0,892 (0,841-0,993)	<b>0,030</b>	0,940 (0,798-1,241)	0,953
CD3+CD8+NKG2D+PD1-	0,953 (0,844-1,071)	0,325	0,953 (0,854-1,035)	0,156	0,964 (0,886-1,097)	0,937
CD3+CD8+NKG2D+PD1-_MFINKG2D+	0,945 (0,867-1,217)	0,746	0,884 (0,789-1,058)	0,281	0,991 (0,937-1,349)	0,530
CD3+CD8+PD1+NKG2D-	0,021 (0,000-0,179)	<b>0,000</b>	0,021 (0,000-0,050)	<b>0,003</b>	0,088 (0,000-0,173)	<b>0,008</b>
CD3+CD8+PD1+NKG2D-_MFIPD1+	0,962 (0,796-1,002)	0,222	0,914 (0,731-0,998)	0,575	0,962 (0,846-0,967)	0,225

TABLA 6	VARIACION POR TRATAMIENTO (POST/PRE)					
Células T CD56+	TOTAL (Q1-Q3)	P-VALOR TOTAL	CPR (Q1-Q3)	P-VALOR CPR	NO-CPR (Q1-Q3)	P-VALOR NO-CPR
CD3+_MFICD56+	1,014 (0,957-1,079)	0,616	1,020 (0,971-1,084)	0,414	1,006 (0,955-1,040)	1,000
CD3+CD56+	1,125 (0,800-1,565)	0,112	1,125 (0,800-1,621)	0,256	1,226 (0,900-1,480)	0,327
CD3+CD56+_MFICD56	1,075 (0,973-1,123)	0,056	1,026 (0,907-1,121)	0,637	1,084 (1,026-1,135)	<b>0,019</b>
CD3+CD56+CD16+	1,052 (0,658-1,315)	0,538	1,038 (0,584-1,355)	0,733	1,119 (0,749-1,339)	0,695
CD3+CD56+CD16+_MFICD56+	1,067 (0,978-1,133)	0,068	1,037 (0,912-1,128)	0,570	1,072 (0,998-1,136)	<b>0,023</b>
CD3+CD56+CD16+_MFICD16+	0,834 (0,642-1,036)	<b>0,044</b>	0,756 (0,647-1,041)	0,112	0,905 (0,647-1,037)	0,388
CD3+CD56+CD16-	1,472 (0,821-2,065)	<b>0,023</b>	1,507 (1,021-2,142)	<b>0,041</b>	1,108 (0,614-1,857)	0,666
CD3+CD56+CD16-_MFICD56+	1,070 (0,958-1,136)	0,067	1,054 (0,928-1,117)	0,629	1,078 (1,006-1,151)	0,091
CD3+CD56+CD107a+	0,464 (0,038-0,946)	0,337	0,317 (0,080-0,919)	0,460	0,449 (0,000-0,844)	0,721
CD3+CD56+CD107a+_MFICD107a+	0,978 (0,876-1,055)	0,865	0,978 (0,845-1,106)	0,678	0,999 (0,973-1,091)	1,000
CD3+CD56+CD107a+_MFICD56+	1,127 (0,884-1,814)	0,140	1,077 (0,826-1,164)	0,953	1,878 (1,672-1,930)	0,068
CD3+CD56+CD107a-	1,174 (0,863-1,541)	0,068	1,123 (0,797-1,517)	0,307	1,156 (0,909-1,545)	0,209
CD3+CD56+CD107a-_MFICD56+	1,024 (0,927-1,114)	0,417	1,010 (0,908-1,100)	0,865	1,026 (0,964-1,086)	0,556
CD3+CD56+CTLA4+	0,817 (0,368-1,128)	0,755	0,850 (0,398-1,283)	0,730	0,370 (0,027-0,817)	0,374
CD3+CD56+CTLA4+_MFICD56+	0,858 (0,772-1,124)	0,679	0,828 (0,766-0,876)	0,678	1,057 (0,864-1,342)	0,866
CD3+CD56+CTLA4+_MFICTLA4+	0,998 (0,913-1,148)	0,845	1,019 (0,991-1,316)	0,214	0,908 (0,532-0,946)	0,128
CD3+CD56+CTLA4-	1,183 (0,836-1,447)	0,084	1,125 (0,815-1,473)	0,281	1,160 (0,959-1,438)	0,182
CD3+CD56+CTLA4-_MFICD56+	1,032 (0,956-1,108)	0,475	0,985 (0,918-1,093)	0,820	1,012 (0,971-1,064)	0,638
CD3+CD56+Nkp44+	0,897 (0,376-1,785)	0,983	0,710 (0,360-1,375)	0,496	1,231 (0,435-3,517)	0,480
CD3+CD56+Nkp44+_MFICD56+	0,979 (0,839-1,493)	<b>0,030</b>	0,941 (0,839-1,265)	0,209	0,961 (0,734-1,392)	0,241
CD3+CD56+Nkp44+_MFINKp44+	0,981 (0,797-1,107)	0,898	0,997 (0,821-1,064)	0,844	0,923 (0,806-1,258)	0,878
CD3+CD56+Nkp44-	1,190 (0,853-1,433)	0,094	1,175 (0,823-1,425)	0,496	1,157 (0,913-1,316)	0,209
CD3+CD56+Nkp44-_MFICD56+	1,012 (0,925-1,117)	0,432	1,012 (0,905-1,110)	0,865	1,010 (0,974-1,097)	0,505
CD3+CD56+CD69+	1,297 (0,556-1,825)	0,658	1,364 (0,710-1,788)	0,427	0,947 (0,541-1,840)	1,000
CD3+CD56+CD69+_MFICD56+	1,020 (0,931-1,118)	0,191	1,017 (0,943-1,114)	0,733	1,025 (0,915-1,170)	0,433
CD3+CD56+CD69+_MFICD69+	1,123 (0,983-1,258)	<b>0,021</b>	1,114 (0,978-1,142)	0,140	1,134 (1,040-1,414)	0,209
CD3+CD56+CD69-	1,144 (0,830-1,395)	0,173	1,167 (0,815-1,399)	0,394	1,140 (0,921-1,332)	0,209
CD3+CD56+CD69-_MFICD56+	1,062 (0,993-1,109)	<b>0,039</b>	1,036 (0,905-1,111)	0,551	1,067 (1,006-1,117)	<b>0,011</b>
CD3+CD56+NKG2D+	0,877 (0,716-1,358)	0,347	0,872 (0,652-1,197)	0,427	0,997 (0,686-1,411)	0,937
CD3+CD56+NKG2D+_MFICD56+	1,060 (0,998-1,121)	<b>0,028</b>	1,019 (0,927-1,124)	0,443	1,061 (1,005-1,111)	<b>0,010</b>
CD3+CD56+NKG2D+_MFINKG2D+	0,911 (0,778-1,128)	0,469	0,844 (0,662-1,086)	0,233	1,036 (0,869-1,223)	0,754
CD3+CD56+NKG2D-	1,256 (0,853-1,961)	<b>0,031</b>	1,256 (0,849-2,608)	<b>0,035</b>	1,169 (0,820-1,582)	0,530
CD3+CD56+NKG2D-_MFICD56+	1,055 (0,961-1,127)	0,110	1,021 (0,959-1,110)	0,532	1,061 (0,960-1,153)	0,158
CD3+CD56+PD1+	0,165 (0,062-0,659)	<b>0,000</b>	0,108 (0,042-0,429)	<b>0,001</b>	0,283 (0,111-0,968)	<b>0,050</b>
CD3+CD56+PD1+_MFICD56+	1,073 (0,940-1,462)	<b>0,048</b>	1,041 (0,910-1,369)	0,397	1,263 (1,027-1,486)	0,147
CD3+CD56+PD1+_MFIPD1+	1,022 (0,827-1,221)	0,773	0,934 (0,822-1,121)	0,507	1,072 (0,838-1,363)	0,239
CD3+CD56+PD1-	1,115 (0,936-1,378)	0,080	1,200 (0,773-1,368)	0,233	1,096 (0,951-1,397)	0,209
CD3+CD56+PD1-_MFICD56+	1,036 (0,982-1,127)	<b>0,044</b>	1,030 (0,913-1,130)	0,496	1,050 (1,012-1,119)	<b>0,023</b>
Células NK	TOTAL (Q1-Q3)	P-VALOR TOTAL	CPR (Q1-Q3)	P-VALOR CPR	NO-CPR (Q1-Q3)	P-VALOR NO-CPR
CD3-CD56+	0,861 (0,615-1,232)	0,177	0,861 (0,555-1,453)	0,334	0,841 (0,584-1,195)	0,433
CD3-CD56+_MFICD56+	1,120 (1,009-1,323)	<b>0,002</b>	1,136 (1,014-1,293)	<b>0,031</b>	1,105 (0,978-1,345)	0,071
CD3-CD56+CD16+	1,017 (0,978-1,045)	0,090	1,012 (0,985-1,046)	0,256	1,027 (0,977-1,066)	0,146
CD3-CD56+CD16+_MFICD56+	1,110 (1,006-1,329)	<b>0,004</b>	1,133 (1,015-1,257)	<b>0,038</b>	1,092 (0,975-1,334)	0,071
CD3-CD56+CD16+_MFICD16+	0,941 (0,842-1,092)	0,252	0,928 (0,843-1,030)	0,334	1,021 (0,831-1,127)	0,480
CD3-CD56+CD16-	1,304 (0,705-2,163)	0,144	1,895 (0,835-2,915)	0,280	1,039 (0,690-2,260)	0,875
CD3-CD56+CD16-_MFICD56+	1,412 (0,968-2,326)	<b>0,023</b>	1,378 (1,019-3,011)	<b>0,027</b>	1,445 (0,731-2,037)	0,594
CD3-CD56+CD107a+	0,464 (0,209-0,789)	<b>0,001</b>	0,493 (0,192-0,710)	<b>0,017</b>	0,392 (0,233-1,161)	<b>0,034</b>
CD3-CD56+CD107a+_MFICD107a+	0,998 (0,902-1,027)	0,675	0,988 (0,931-1,036)	0,778	1,000 (0,797-1,030)	0,919
CD3-CD56+CD107a+_MFICD56+	1,325 (0,963-1,588)	<b>0,006</b>	1,323 (1,034-1,833)	<b>0,009</b>	1,435 (0,895-1,619)	0,131
CD3-CD56+CD107a-	1,003 (0,971-1,040)	0,665	0,983 (0,966-1,032)	0,910	1,010 (0,991-1,043)	0,272
CD3-CD56+CD107a-_MFICD56+	1,110 (1,024-1,287)	<b>0,005</b>	1,104 (1,030-1,265)	<b>0,027</b>	1,109 (0,952-1,260)	0,117
CD3-CD56+CTLA4+	0,768 (0,272-1,048)	<b>0,041</b>	0,743 (0,301-0,941)	0,191	0,611 (0,219-1,287)	0,071
CD3-CD56+CTLA4+_MFICD56+	1,117 (0,931-1,434)	0,065	1,147 (0,938-1,433)	0,071	1,030 (0,945-1,399)	0,477
CD3-CD56+CTLA4+_MFICTLA4+	0,984 (0,870-1,038)	0,189	1,003 (0,895-1,059)	0,610	0,933 (0,842-1,005)	0,093
CD3-CD56+CTLA4-	0,980 (0,954-1,004)	0,090	0,980 (0,949-0,999)	0,057	0,998 (0,971-1,043)	0,969
CD3-CD56+CTLA4-_MFICD56+	1,120 (1,018-1,278)	<b>0,004</b>	1,099 (1,031-1,280)	<b>0,027</b>	1,099 (0,953-1,265)	0,084
CD3-CD56+Nkp44+	0,694 (0,352-1,136)	<b>0,043</b>	0,694 (0,327-1,068)	<b>0,048</b>	0,797 (0,367-1,303)	0,530
CD3-CD56+Nkp44+_MFICD56+	1,676 (1,155-4,247)	<b>0,000</b>	2,034 (1,255-4,360)	<b>0,003</b>	1,315 (1,146-2,204)	<b>0,004</b>
CD3-CD56+Nkp44+_MFINKp44+	0,947 (0,824-1,142)	0,170	0,991 (0,827-1,087)	0,320	0,921 (0,805-1,123)	0,308
CD3-CD56+Nkp44-	0,997 (0,953-1,052)	0,721	0,997 (0,962-1,037)	0,955	1,034 (0,964-1,074)	0,388
CD3-CD56+Nkp44-_MFICD56+	1,140 (1,011-1,281)	<b>0,007</b>	1,114 (1,017-1,262)	<b>0,036</b>	1,133 (0,941-1,169)	0,126
CD3-CD56+CD69+	1,122 (0,536-1,599)	0,462	1,519 (0,972-2,181)	0,281	0,785 (0,252-1,317)	0,099
CD3-CD56+CD69+_MFICD56+	1,220 (1,127-1,386)	<b>0,000</b>	1,228 (1,126-1,472)	<b>0,023</b>	1,155 (1,123-1,256)	<b>0,003</b>
CD3-CD56+CD69+_MFICD69+	0,995 (0,805-1,087)	0,341	1,035 (0,849-1,170)	0,910	0,950 (0,827-1,076)	0,308
CD3-CD56+CD69-	0,975 (0,930-1,238)	0,673	0,938 (0,920-0,998)	0,233	1,063 (0,963-1,554)	0,158
CD3-CD56+CD69-_MFICD56+	1,039 (0,977-1,340)	<b>0,022</b>	1,087 (0,997-1,209)	0,065	1,026 (0,942-1,370)	0,347
CD3-CD56+NKG2D+	0,980 (0,745-1,133)	0,284	0,946 (0,739-1,090)	0,156	1,003 (0,809-1,249)	0,754
CD3-CD56+NKG2D+_MFICD56+	1,149 (1,000-1,340)	<b>0,002</b>	1,130 (1,038-1,306)	<b>0,035</b>	1,145 (0,993-1,473)	0,062
CD3-CD56+NKG2D+_MFINKG2D+	0,940 (0,834-1,105)	0,309	0,903 (0,721-1,021)	0,140	0,962 (0,925-1,158)	0,695
CD3-CD56+NKG2D-	1,151 (0,830-1,603)	0,214	1,413 (0,853-2,249)	0,140	1,095 (0,691-1,265)	0,875
CD3-CD56+NKG2D-_MFICD56+	1,142 (1,004-1,338)	<b>0,003</b>	1,142 (1,103-1,381)	<b>0,041</b>	1,116 (0,986-1,198)	0,099
CD3-CD56+PD1+	0,455 (0,226-0,961)	<b>0,012</b>	0,473 (0,157-0,737)	<b>0,006</b>	0,579 (0,282-1,823)	0,530
CD3-CD56+PD1+_MFICD56+	1,353 (1,147-1,899)	<b>0,035</b>	1,314 (1,090-2,022)	0,112	1,328 (1,093-1,587)	0,480
CD3-CD56+PD1+_MFIPD1+	0,829 (0,573-1,025)	<b>0,001</b>	0,829 (0,657-1,015)	<b>0,012</b>	0,919 (0,563-1,035)	0,092
CD3-CD56+PD1-	1,000 (0,955-1,027)	0,785	0,993 (0,959-1,024)	0,551	1,005 (0,947-1,017)	0,929
CD3-CD56+PD1-_MFICD56+	1,133 (1,015-1,311)	<b>0,004</b>	1,133 (1,015-1,285)	<b>0,027</b>	1,118 (0,959-1,329)	0,099
CD3-CD56+NKG2D+PD1+	0,600 (0,184-1,412)	0,080	0,600 (0,179-0,993)	<b>0,026</b>	0,824 (0,183-2,717)	0,875
CD3-CD56+NKG2D+PD1+_MFINKG2D+	0,975 (0,757-1,357)	0,927	0,891 (0,690-1,189)	0,379	1,199 (0,937-1,574)	0,213
CD3-CD56+NKG2D+PD1+_MFIPD1+	0,969 (0,821-1,018)	<b>0,016</b>	0,974 (0,765-1,011)	<b>0,047</b>	0,968 (0,903-1,046)	0,423
CD3-CD56+NKG2D+PD1-	0,958 (0,788-1,151)	0,299	0,923 (0,796-1,059)	0,088	1,045 (0,829-1,219)	0,754
CD3-CD56+NKG2D+PD1-_MFINKG2D+	0,946 (0,816-1,094)	0,347	0,890 (0,706-1,015)	0,125	1,019 (0,899-1,198)	0,530
CD3-CD56+NKG2D+PD1-	0,548 (0,145-1,068)	<b>0,020</b>	0,454 (0,158-0,927)	<b>0,029</b>	0,754 (0,095-1,322)	0,388
CD3-CD56+NKG2D+PD1-_MFIPD1+	0,889 (0,703-1,013)	<b>0,016</b>	0,891 (0,849-0,987)	0,133	0,838 (0,641-1,050)	0,173

**Tablas 7 y 8. Comparación de los factores solubles medidos en plasma al momento del diagnóstico (pre tratamiento) y después del tratamiento neo-adyuvante (post tratamiento) con la respuesta patológica.** Se indican las medianas de cada variable con sus intercuartiles (Q1 y Q3) en pacientes con respuesta patológica completa (CPR) y pacientes con respuesta patológica no completa (no CPR), así como el p-valor obtenido del análisis estadístico de Mann-Whitney.

TABLA 7		PRE TRATAMIENTO			POST TRATAMIENTO		
FACTOR SOLUBLE	CPR (Q1-Q3)	NO-CPR (Q1-Q3)	P-VALOR	CPR (Q1-Q3)	NO-CPR (Q1-Q3)	P-VALOR	
BTLA	12290 (7852-18874)	15513 (9473-23468)	0,172	9205 (7634-18119)	9684 (5438-15796)	0,626	
CD27	4200 (3393-5123)	3647 (3059-4719)	0,733	3604 (2623-6544)	4063 (2412-5780)	0,715	
CD28	58729 (35377-76874)	60583 (45873-103406)	0,283	37790 (25173-71002)	41542 (23971-66753)	0,871	
CD40	1417 (1181-1488)	1159 (984-1854)	1	1301 (990-1562)	1337 (910-1608)	1	
CD80B7-1	2726 (1931-3187)	2943 (2365-4057)	0,223	2188 (1984-2889)	2259 (1290-3085)	0,491	
CD86B7-2	17619 (8650-21870)	17436 (11526-30179)	0,205	11881 (7872-18900)	13163 (7222-20109)	0,746	
CTLA-4	979 (629-1466)	1252 (741-1768)	0,354	668 (478-1394)	775 (412-1072)	0,685	
GITR	3029 (1583-4513)	4004 (2399-5695)	0,157	1845 (1212-4050)	2417 (1549-3497)	0,808	
GITRL	6835 (5281-9155)	8662 (6275-12200)	0,283	5970 (4803-9595)	7239 (4241-10121)	0,808	
HVEM	2365 (1946-2959)	2200 (1717-2882)	0,464	2459 (1953-2738)	2946 (2059-3084)	0,503	
ICOS	19724 (15719-27089)	25884 (19389-35734)	0,205	18160 (14598-21839)	20546 (11454-27709)	0,839	
LAG-3	489012 (413913-563847)	499219 (447391-534896)	0,884	425328 (393000-500000)	398544 (338610-505196)	0,626	
PD-1	13624 (8137-17039)	14210 (9367-21445)	0,38	14278 (12517-18271)	14139 (11030-20024)	0,808	
PD-L1	1856 (1107-2505)	2123 (1211-3262)	0,262	1361 (979-1877)	1512 (755-2078)	0,808	
TIM-3	2686 (2132-4279)	2848 (2182-3262)	1	3775 (3357-4439)	3526 (2816-4817)	0,935	
TLR-2	36680 (24840-52178)	38459 (30724-58259)	0,449	29649 (24026-39662)	28325 (19582-41230)	0,685	

TABLA 8A		PRE TRATAMIENTO			POST TRATAMIENTO		
Citoquinas	CPR (Q1-Q3)	NO-CPR (Q1-Q3)	P-VALOR	CPR (Q1-Q3)	NO-CPR (Q1-Q3)	P-VALOR	
4-1BB	3484 (1976-6728)	1476 (982-3523)	0,097	3328 (1822-9886)	935 (414-2147)	<b>0,029</b>	
6CKine	831 (552-1084)	747 (532-864)	0,464	878 (556-1049)	770 (507-1016)	0,808	
Activin A	1513 (902-2033)	1182 (968-1699)	0,661	1469 (729-2137)	1056 (642-1392)	0,33	
AgRP	1753 (1242-2690)	1605 (1487-2238)	0,961	1972 (1138-3004)	1956 (1332-2869)	0,776	
ALCAM	11356 (9135-12382)	9968 (7140-11509)	0,172	11157 (10621-12402)	10021 (7664-14708)	0,33	
ANG	98194 (84062-106269)	101459 (91382-105481)	0,435	102623 (99728-108412)	102839 (95057-107748)	0,372	
ANG-1	28277 (9576-41082)	34877 (23428-55926)	0,188	11968 (8251-23575)	13410 (7880-23482)	0,871	
Angiostatin	13527 (11199-15114)	12661 (11509-17701)	0,591	15305 (13520-17524)	15519 (13607-18246)	0,871	
AR	2083 (1699-3400)	3401 (1515-4863)	0,661	2696 (1763-3906)	3232 (1602-3397)	0,839	
Axl	868 (510-1372)	596 (502-1027)	0,464	652 (418-1337)	602 (512-968)	0,903	
B7-1	1407 (956-3231)	1626 (949-2515)	0,884	1666 (606-3931)	1236 (894-1373)	0,516	
BCMA	15359 (13784-17841)	13152 (12647-14803)	0,107	14287 (12101-23775)	12146 (10646-12869)	<b>0,047</b>	
BDNF	20274 (9262-74564)	41707 (20831-90633)	0,205	11329 (5527-20383)	7529 (5920-13299)	0,441	
bFGF	1011 (671-2013)	1050 (422-2373)	0,591	1079 (641-2328)	1433 (412-2373)	0,776	
BLC	3038 (1718-4386)	3174 (1975-4527)	0,77	3270 (1866-4831)	3589 (1635-4833)	0,871	
BMP-4	2434 (1393-3201)	2427 (1755-2993)	0,807	1981 (1416-3432)	1856 (1255-2969)	0,516	
BMP-5	2918 (1897-4157)	2697 (2247-3974)	0,696	3132 (2148-4373)	2187 (1937-2858)	0,224	
BMP-7	1633 (1377-2571)	2542 (2049-3955)	0,083	2250 (1742-3685)	2542 (1828-3273)	0,626	
b-NGF	1354 (1067-2099)	2297 (1724-3488)	<b>0,028</b>	1561 (1096-2512)	1997 (969-2848)	0,598	
BTC	1172 (857-1355)	1292 (1133-1480)	0,262	886 (602-1128)	982 (863-1269)	0,224	
CathepsinS	31899 (23326-37996)	30007 (25251-33671)	0,626	29308 (23792-38562)	24967 (23390-31589)	0,33	
CCL28	1435 (1093-2862)	1352 (1147-1801)	0,696	1160 (897-1933)	1057 (930-1145)	0,372	
CD 40	736 (621-1070)	763 (470-1075)	0,845	675 (617-1035)	646 (418-1257)	0,429	
CD14	19235 (15702-21805)	20931 (20247-24659)	0,143	21550 (17346-25710)	24156 (20805-27924)	0,24	
CD30	1345 (968-1803)	1458 (1269-2217)	0,38	1108 (979-2021)	1309 (1202-1567)	0,626	
CD40L	3083 (2279-4472)	4390 (2879-5451)	0,306	2920 (1828-4334)	2979 (1451-4417)	0,746	
CEACAM-1	5526 (4559-6577)	6300 (4921-8631)	0,306	5753 (5033-7610)	5889 (5611-7334)	0,394	
Contactin-2	1897 (1163-3255)	1450 (1156-2965)	0,661	2272 (1122-3792)	1203 (927-1784)	0,394	
Cripto-1	1735 (729-2852)	1416 (464-2964)	0,845	1271 (448-5539)	820 (332-4464)	0,903	
CTACK	13090 (9980-14921)	13699 (11434-17904)	0,329	13282 (10957-18922)	16343 (14100-19359)	0,311	
CXCL16	29070 (24758-32605)	26262 (22930-29313)	0,223	27482 (22029-34614)	27297 (26031-28967)	0,903	
DAN	593 (417-733)	553 (327-671)	0,558	530 (391-707)	516 (386-756)	0,984	
DKK-1	1304 (878-1786)	966 (697-1374)	0,172	1101 (941-1644)	712 (644-1169)	0,089	
DR6	65859 (52015-77996)	67225 (53641-74676)	0,845	82283 (59360-98064)	80422 (71389-88957)	1	
Dtk	2372 (1651-3682)	1851 (1532-3278)	0,407	2410 (1778-4178)	1990 (1579-2793)	0,372	
E-Cadherin	885 (736-1342)	683 (435-970)	0,188	886 (718-1158)	719 (528-1157)	0,516	
EGF	18613 (13440-34898)	26638 (15009-34349)	0,626	12796 (10164-15642)	14461 (7399-19096)	0,871	
EGF R	101190 (94579-111492)	95720 (92629-113694)	0,591	105438 (99159-120670)	109368 (100521-117857)	0,808	
EG-VEGF	3387 (1167-5690)	4498 (2975-6425)	0,329	3761 (1785-5440)	3671 (2442-5149)	0,808	
ENA-78	1508 (972-6927)	1892 (1219-5121)	0,961	1491 (614-2335)	914 (650-3161)	0,776	
Endoglin	9624 (6120-14514)	9836 (8828-14707)	0,558	9036 (6644-10987)	9147 (7260-12121)	0,746	
Eotaxin	5460 (4544-6134)	6297 (5343-7911)	0,223	6630 (4211-8577)	6935 (6611-7572)	0,24	
Eotaxin-2	6145 (4301-9027)	8759 (6878-10875)	0,157	5855 (4699-9835)	8623 (4974-12412)	0,351	
Eotaxin-3	108 (48-422)	90 (59-210)	0,807	171 (85-186)	111 (85-186)	0,311	
EpCAM	1609 (862-1825)	1029 (890-1204)	0,558	1067 (684-1813)	1070 (592-1643)	0,655	
ErbB3	2479 (1695-4926)	3348 (2802-3814)	0,626	1957 (1168-3626)	5046 (1533-6328)	0,156	
E-Selectin	3060 (2568-3797)	3676 (2722-5050)	0,306	3999 (2933-5122)	4367 (3299-4723)	0,656	
Fas	1096 (685-1402)	1026 (811-2305)	0,495	1209 (791-2161)	2055 (1342-2539)	0,074	
FAS L	1769 (982-2588)	1037 (573-1641)	0,13	935 (649-3046)	611 (541-1581)	0,24	
Fcr RIIBC	1140 (652-2160)	1139 (665-1610)	0,77	1089 (778-1516)	1351 (669-2017)	0,53	
FGF-4	1879 (1469-4037)	3132 (2277-3948)	0,205	2151 (1786-4533)	1925 (1683-3417)	0,491	
FGF-7	1648 (1218-3498)	2268 (1613-3445)	0,626	2575 (1818-3774)	1942 (1025-3080)	0,351	
Flt-3L	2584 (1663-2875)	3239 (2491-4420)	0,107	3798 (2814-4367)	4739 (3806-5882)	<b>0,039</b>	
Follistatin	11520 (10145-14958)	11061 (8361-14449)	0,661	13323 (10199-15090)	12615 (10506-15955)	0,968	

TABLA 8B	PRE TRATAMIENTO			POST TRATAMIENTO		
Citoquinas	CPR (Q1-Q3)	NO-CPR (Q1-Q3)	P-VALOR	CPR (Q1-Q3)	NO-CPR (Q1-Q3)	P-VALOR
Galectin-7	6027 (3951-10123)	4029 (1921-5182)	0,083	5062 (3269-10526)	2962 (1964-6648)	0,181
GCP-2	225 (12-433)	101 (20-294)	0,463	118 (11-275)	161 (2-253)	0,776
G-CSF	1055 (672-1662)	1187 (1096-1407)	0,733	1072 (637-1421)	699 (557-1009)	0,351
GDF-15	119261 (99769-124808)	122197 (110571-142077)	0,242	130036 (109429-160395)	155727 (130079-213099)	0,068
GDNF	1695 (1268-2204)	2177 (1721-3567)	0,205	2064 (1474-3386)	1534 (1064-3285)	0,626
GH	4083 (3070-5528)	4177 (2951-8593)	0,77	3786 (3206-5627)	4922 (2924-12336)	0,351
GITR	1314 (581-2556)	1049 (468-1531)	0,407	1238 (670-3117)	890 (506-1477)	0,274
GM-CSF	6333 (4417-10120)	7925 (6669-12239)	0,157	2982 (2543-6382)	3429 (2826-5215)	0,903
GRO	1415 (789-1824)	1179 (884-1708)	0,922	652 (471-954)	806 (595-1643)	0,292
HB-EGF	1698 (969-3195)	2268 (1084-3939)	0,495	2051 (1280-3346)	1625 (885-2967)	0,685
HCC-1	58845 (52794-66036)	59183 (52411-65838)	0,807	62311 (55818-71047)	63745 (58612-68062)	1
HCC-4	121797 (109554-135459)	113372 (100899-129187)	0,283	112204 (100558-128886)	119492 (104524-129781)	0,746
HGF	2102 (1805-3655)	3705 (3122-4686)	0,071	2132 (1571-3617)	2768 (2462-4135)	0,209
HVEM	2402 (2184-2987)	2305 (1841-3240)	0,77	2590 (1620-3531)	2292 (1888-2897)	0,935
I-309	1123 (914-1628)	939 (809-1518)	0,354	1115 (721-1686)	808 (565-953)	0,194
ICAM-1	181142 (72219-249328)	97585 (67894-153457)	0,495	182625 (90573-224632)	100455 (72850-164065)	0,441
ICAM-2	21903 (17468-24120)	18371 (16011-19596)	0,188	19985 (17044-21357)	17539 (15917-19524)	0,24
ICAM-3	0 (0-84)	0 (0-0)	0,104	0 (0-55)	0 (0-0)	0,312
IFNg	5475 (4065-9358)	6968 (5261-10289)	0,242	2985 (2415-6761)	3234 (2630-4353)	0,871
IGFBP-1	18756 (11311-37777)	30089 (23437-39063)	0,118	25576 (15046-37699)	43276 (19462-53590)	0,292
IGFBP-2	46396 (40339-50568)	52627 (45587-55564)	0,242	45928 (42150-48981)	50017 (46623-52193)	0,068
IGFBP-3	8138 (6858-13113)	8414 (6433-10506)	0,884	10150 (7433-16378)	8958 (7351-13032)	0,626
IGFBP-4	14468 (10845-22262)	12169 (10549-17100)	0,591	12351 (8915-19640)	17239 (12313-21243)	0,209
IGFBP-6	42639 (40936-46945)	43590 (39503-45496)	0,77	41556 (37611-45828)	43321 (38545-45538)	0,543
IGF-I	2079 (1535-2425)	2242 (1878-4174)	0,262	1861 (1539-3097)	2027 (1633-3546)	0,626
IL-1 R1	1631 (1138-2165)	1411 (1026-2173)	0,77	1447 (1188-2709)	1394 (1167-1717)	0,441
IL-10	4682 (3179-7912)	6856 (4963-10091)	0,172	2424 (1914-4804)	3404 (1999-4557)	0,715
IL-10 Rb	803 (635-1039)	1348 (454-2430)	0,526	776 (508-1266)	1045 (596-1951)	0,53
IL-11	2212 (1790-3641)	2880 (2204-4048)	0,38	1639 (1069-2920)	1559 (1163-1915)	0,685
IL-12p40	778 (407-1542)	1175 (570-1714)	0,591	1360 (644-1859)	1897 (735-3751)	0,598
IL-12p70	1024 (711-1678)	1249 (774-1826)	0,591	946 (447-1076)	693 (412-871)	0,598
IL-13	2999 (2530-5256)	4832 (3745-6722)	0,157	1799 (1591-3652)	2120 (1759-3063)	0,903
IL-13 R1	2236 (1469-2976)	2618 (2074-3203)	0,317	2030 (1271-2452)	2398 (1470-4570)	0,292
IL-13 R2	1821 (1414-2872)	2451 (1747-2797)	0,733	1955 (1255-3376)	1770 (1218-2386)	0,776
IL-15	2183 (1285-5221)	2974 (1921-3801)	0,591	2320 (841-4945)	1366 (983-2361)	0,417
IL-16	4502 (1567-16655)	4264 (2933-19672)	0,626	2948 (1867-8554)	2712 (1428-4471)	0,429
IL-17	1100 (834-1594)	1248 (1115-1819)	0,306	1017 (669-1255)	829 (690-1496)	0,903
IL-17B	4241 (2270-10255)	4898 (2243-6681)	0,626	3260 (1759-6925)	2469 (1680-5486)	0,626
IL-17F	1950 (1041-3504)	925 (715-2451)	0,097	1227 (851-4111)	849 (586-1295)	0,24
IL-17R	2868 (1788-3438)	2464 (1886-2857)	0,626	2238 (1537-3331)	1467 (1352-2081)	0,292
IL-18 BPa	683 (486-1076)	568 (522-824)	0,542	596 (425-836)	530 (432-625)	0,465
IL-1a	1527 (1258-2810)	1898 (1718-2518)	0,354	1370 (1143-2086)	1250 (1121-1799)	0,808
IL-1b	333 (148-1025)	467 (248-1160)	0,464	302 (163-1126)	535 (254-1022)	0,556
IL-1ra	1482 (1058-1882)	1830 (1523-2190)	0,157	1302 (778-2487)	1046 (734-1637)	0,57
IL-2	4272 (3062-7814)	5997 (4145-8754)	0,262	2485 (1976-5462)	2535 (2341-3354)	0,935
IL-2 Ra	1689 (1266-2157)	1561 (1269-2021)	0,845	1814 (1289-2378)	1535 (1316-2374)	0,871
IL-2 Rb	1328 (1073-2589)	2461 (1320-3342)	0,354	1632 (1006-3594)	1749 (1243-2501)	0,871
IL-2 Rg	667 (493-963)	876 (544-1785)	0,464	618 (468-1424)	748 (521-1204)	0,792
IL-21R	886 (77-1854)	290 (149-852)	0,525	644 (55-2109)	241 (131-437)	0,247
IL-23	4156 (3198-5549)	3465 (3075-3854)	0,118	4091 (3407-5318)	3220 (2888-3983)	0,114
IL-28A	534 (471-827)	441 (291-815)	0,449	430 (352-721)	357 (216-442)	0,194
IL-29	1393 (858-1506)	1293 (1226-1715)	0,435	1060 (495-1386)	1211 (1115-1357)	0,256
IL-31	1909 (515-3444)	412 (190-1586)	0,13	992 (451-10847)	583 (198-973)	0,156
IL-4	725 (638-1316)	844 (734-1135)	0,526	659 (505-1032)	704 (492-1133)	0,871
IL-5	4178 (3387-7669)	5851 (4626-10257)	0,157	2267 (1762-5508)	2451 (1931-3549)	0,935
IL-6	3515 (2916-5792)	4776 (3610-5988)	0,354	2370 (1996-4255)	2446 (2129-3138)	0,903
IL-6sR	119242 (107530-130181)	120434 (111693-122941)	0,696	116775 (112127-135508)	125238 (118555-131348)	0,441
IL-7	6037 (4058-9958)	7217 (5897-11945)	0,242	3240 (2442-7590)	3478 (2884-4265)	0,935
IL-8	4887 (3597-11658)	6555 (5223-8731)	0,626	5662 (2508-7604)	3282 (2865-4533)	0,57
IL-9	1257 (1014-1410)	1295 (1172-1408)	0,77	1067 (868-1178)	1107 (1044-1178)	0,491
Insulin	1540 (1168-2166)	2513 (1497-3117)	0,064	1426 (919-1819)	1693 (1163-2365)	0,224
IP-10	8640 (6277-11065)	8665 (4609-1718)	0,884	8679 (7726-11008)	9235 (6683-20900)	0,685
I-TAC	377 (172-498)	320 (226-637)	0,981	280 (217-394)	289 (174-554)	0,903
LAP	27560 (15980-58500)	31724 (22973-70102)	0,283	15341 (11539-24463)	19810 (15568-36117)	0,441
LIF	576 (526-780)	754 (697-795)	0,262	658 (513-814)	681 (626-746)	0,626
LIGHT	784 (576-1108)	626 (481-1010)	0,526	615 (373-972)	536 (337-751)	0,685
LIMP11	5033 (2097-9240)	2746 (1393-6092)	0,223	3798 (2025-16770)	1502 (1034-3547)	0,068
Lipocalin-2	43538 (39692-46709)	45632 (42539-47501)	0,329	44641 (41234-51436)	48313 (42354-50052)	0,491
L-Selectin	28219 (22790-33072)	29070 (26129-35747)	0,329	25272 (20842-29799)	27332 (26419-31156)	0,074
Lymphotactin	254 (109-320)	184 (73-365)	0,884	154 (35-235)	93 (34-264)	0,715
LYVE-1	65582 (55407-71134)	68683 (64521-74506)	0,329	64047 (59885-70576)	67113 (61558-71312)	0,656
MCP-1	7827 (6162-10054)	7898 (6133-11683)	0,558	7592 (5414-11013)	5968 (5184-7427)	0,351
MCP-2	1245 (966-2186)	1477 (657-2271)	1	1188 (371-2288)	1120 (670-2131)	0,516
MCP-3	390 (225-676)	794 (395-931)	0,088	383 (160-619)	419 (339-577)	0,292
MCP-4	431 (242-793)	447 (256-940)	0,733	361 (167-635)	367 (191-698)	0,7
MCSF	513 (284-647)	429 (275-679)	0,661	633 (382-1556)	348 (188-494)	0,035
MCSF R	76933 (67614-81669)	62666 (58747-71533)	0,051	82262 (74788-87769)	76392 (63211-81837)	0,292
MDC	871 (656-1664)	1538 (927-2839)	0,242	1256 (669-1820)	1543 (1124-2285)	0,543
MICA	231 (56-391)	437 (142-782)	0,282	276 (237-541)	358 (100-580)	0,808
MICB	169 (11-483)	29 (0-196)	0,308	195 (6-663)	115 (0-541)	0,681
MIF	6374 (3566-13753)	10689 (5417-19011)	0,242	3552 (2850-6783)	5230 (2402-6737)	0,935
MIG	1562 (856-2339)	1212 (704-1700)	0,38	3258 (1478-3977)	2649 (1498-9096)	0,776
MIP-1a	3370 (2257-3993)	2454 (1619-3248)	0,13	2986 (1925-4765)	1885 (1652-2211)	0,057
MIP-1b	10247 (7218-15193)	16224 (9415-24608)	0,354	9681 (7481-17849)	11253 (6826-14157)	0,903
MIP-1d	47617 (32213-61904)	37201 (31290-56485)	0,591	62595 (38642-69387)	56547 (46146-66119)	0,935
MIP-3a	455 (382-630)	450 (262-779)	0,733	336 (260-416)	294 (149-599)	0,935
MIP-3b	8849 (6181-15037)	6768 (4116-12653)	0,188	8304 (5270-17211)	7812 (5128-14281)	0,776
MPIF-1	20459 (9510-22373)	14220 (11136-17443)	0,77	13668 (10625-17790)	17045 (14899-23676)	0,047
MSPa	1386 (1208-1506)	1449 (1270-1525)	0,696	1174 (944-1276)	1205 (1096-1352)	0,584
NAP-2	61167 (56746-71931)	67613 (62751-75366)	0,242	65880 (53783-78189)	68286 (62247-72587)	0,871
NGF R	2752 (1837-3093)	2804 (1783-3417)	0,526	2581 (2090-3038)	1980 (1634-3103)	0,441
NrCAM	4284 (2827-7743)	4274 (3288-4869)	0,626	4304 (3859-5671)	3396 (2243-4536)	0,133
NRG1-b1	1280 (597-2475)	996 (361-1651)	0,558	1495 (320-3190)	703 (378-1061)	0,224



TABLA 8C		PRE TRATAMIENTO			POST TRATAMIENTO		
Citoquinas	CPR (Q1-Q3)	NO-CPR (Q1-Q3)	P-VALOR	CPR (Q1-Q3)	NO-CPR (Q1-Q3)	P-VALOR	
NT-3	1769 (1017-2626)	3834 (2490-4948)	0,015	1684 (1171-2979)	3108 (1229-4601)	0,209	
NT-4	3556 (1946-4866)	3843 (3393-5941)	0,329	3287 (2592-5626)	3397 (2439-5380)	0,871	
OPG	2993 (2164-7061)	2632 (2342-5174)	0,626	3761 (2088-5949)	2229 (2081-3465)	0,209	
OPN	68085 (35065-75540)	57968 (36997-69406)	0,495	53342 (11844-70850)	63020 (31664-78576)	0,24	
PAI-I	19176 (17713-26096)	23402 (21971-27925)	0,283	18628 (14600-24121)	19248 (13102-21822)	0,746	
PARC	29833 (26588-35671)	27498 (24089-30184)	0,118	30666 (27808-38411)	27292 (24693-30611)	0,035	
PDGF Rb	1196 (912-1749)	1262 (933-1573)	0,845	1271 (858-2319)	1223 (922-1536)	0,685	
PDGF-AA	59173 (39415-79729)	71689 (53124-78337)	0,464	38154 (23455-51886)	36495 (22904-48038)	0,656	
PDGF-AB	23397 (17760-27556)	30891 (28623-33117)	0,064	10161 (7588-19527)	14446 (9870-16729)	0,685	
PDGF-BB	156506 (84824-249727)	216160 (123618-264278)	0,223	72003 (55460-184220)	92402 (74234-137198)	0,808	
PECAM-1	1460 (1151-2076)	2431 (1690-3254)	0,071	1414 (1099-2118)	1764 (1510-2083)	0,292	
PF4	11153 (9270-12159)	9955 (8849-10725)	0,242	12574 (9082-13840)	12385 (10423-14043)	0,465	
PIGF	950 (665-2281)	2310 (1937-3588)	0,107	1643 (643-2336)	1668 (762-2941)	0,685	
RAGE	24499 (18727-36396)	31472 (24653-37610)	0,38	29308 (23869-38066)	36450 (28547-41081)	0,256	
RANTES	384986 (365126-415213)	370921 (355832-393446)	0,242	378271 (340855-417515)	384351 (362550-421125)	0,656	
Resistin	92633 (84591-124712)	106522 (86084-123598)	0,661	96289 (75527-105953)	87970 (79095-106397)	0,903	
SCF	2775 (1839-4104)	3655 (2278-4912)	0,283	3088 (1842-5477)	2892 (2059-5286)	0,903	
SCF R	44920 (31473-50979)	43367 (37028-52554)	0,661	54251 (47816-61398)	54796 (47927-61057)	0,776	
SDF-1a	1903 (875-2749)	1021 (810-1579)	0,13	1361 (789-1982)	1059 (909-1311)	0,372	
SDF-1b	1416 (887-2371)	1935 (1003-2792)	0,626	1476 (722-3798)	1464 (684-2061)	0,839	
sgp130	11333 (10214-13672)	11729 (10672-13330)	0,922	11655 (10971-12240)	12123 (11529-12876)	0,311	
Shh N	903 (395-1228)	630 (362-832)	0,164	551 (313-948)	384 (203-879)	0,808	
Siglec-5	300031 (232318-320314)	274955 (232299-310151)	0,526	263856 (212625-345906)	299366 (229696-319396)	0,871	
ST2	1952 (982-2832)	1544 (1199-2224)	0,696	1530 (724-3219)	921 (739-2625)	0,746	
TARC	987 (768-2186)	2475 (1777-3041)	0,057	1354 (1052-4790)	2250 (1691-2917)	0,34	
TECK	529 (292-997)	446 (325-799)	0,751	590 (341-1006)	581 (350-881)	0,935	
TGFa	2832 (1218-5881)	2193 (950-3422)	0,262	2470 (1001-4956)	998 (685-1903)	0,062	
TGFb	3917 (2987-6556)	3896 (3350-4717)	0,526	3717 (3147-5632)	3129 (2910-3487)	0,068	
TGF-b2	1509 (863-2063)	753 (678-1997)	0,38	1269 (923-2033)	1077 (576-1977)	0,746	
TGFb3	1320 (640-2638)	1212 (735-1920)	0,961	1625 (1145-2563)	906 (576-2403)	0,24	
Tie-2	702 (453-886)	949 (446-1833)	0,329	648 (252-998)	597 (358-1727)	0,685	
TIM-1	3667 (2100-6784)	1975 (1250-4501)	0,157	3927 (2093-9086)	2694 (1487-3768)	0,156	
TIMP-1	138734 (123020-147489)	129648 (119505-138920)	0,329	136404 (125981-152076)	143892 (135574-152475)	0,394	
TIMP-2	204192 (183323-214708)	193250 (139078-239812)	0,961	220404 (191282-233167)	226024 (178749-247597)	0,598	
TNF RI	21265 (16959-28358)	23387 (14721-26710)	0,961	21990 (17163-26741)	26721 (21665-33854)	0,096	
TNF RII	49528 (42313-61140)	53203 (48892-54703)	0,961	57939 (52181-70826)	62702 (55298-74667)	0,372	
TNFA	4530 (3986-9174)	6619 (4441-9556)	0,329	3053 (2499-6324)	3084 (2395-4005)	0,598	
TNFB	6441 (4742-10446)	8380 (6037-11467)	0,283	4037 (3046-7669)	3870 (3183-4619)	0,685	
TPO	611 (547-1345)	909 (587-1342)	0,751	758 (311-1577)	621 (456-1435)	0,984	
TRAIL R3	3582 (2181-4700)	4743 (4071-6400)	0,057	4021 (2140-4873)	4679 (2781-5192)	0,372	
TRAIL-R4	583 (471-1269)	1110 (348-1625)	0,542	404 (168-1341)	848 (566-2098)	0,273	
Trappin-2	99224 (88666-103519)	92976 (88264-100769)	0,661	98727 (92066-106749)	92283 (84062-94852)	0,052	
TREM-1	1168 (833-1669)	982 (635-1520)	0,354	1331 (613-2218)	653 (587-1133)	0,181	
TSLP	3235 (576-5414)	682 (339-1698)	0,097	636 (390-4272)	382 (230-765)	0,24	
uPAR	4240 (2531-5818)	6237 (4039-6839)	0,107	3623 (2477-4658)	4488 (3692-5426)	0,209	
VCAM-1	43922 (28163-47175)	39298 (30116-45176)	0,884	39361 (36007-49083)	47091 (31938-57120)	0,808	
VEGF	2303 (1674-3306)	2269 (1784-2986)	0,961	2229 (1227-2772)	1402 (1126-4405)	0,656	
VEGF R1	728 (520-1116)	784 (489-2284)	0,788	652 (350-993)	516 (340-1291)	0,839	
VEGF R2	9315 (6804-10797)	8342 (7226-9491)	0,393	10256 (7955-11368)	9039 (7512-10974)	0,53	
VEGF R3	2104 (1828-2996)	2431 (1445-4912)	0,942	2381 (1605-4683)	1807 (1233-4105)	0,394	
VEGF-C	1394 (982-2604)	1525 (1128-2300)	0,922	1470 (701-2416)	1127 (871-2075)	0,67	
VEGF-D	2110 (1394-2606)	3189 (2125-4581)	0,045	2063 (1549-3077)	3058 (2031-4697)	0,156	
XEDAR	902 (661-1704)	1031 (592-1822)	0,845	1155 (793-1912)	789 (680-1282)	0,144	

**Tablas 9 y 10. Efecto del tratamiento neo-adyuvante en los factores solubles medidos en plasma de la totalidad de los pacientes (TOTAL), en los pacientes con respuesta patológica completa (CPR) y pacientes con respuesta patológica no completa (no CPR).** Se indican las medianas de la variación en cada variable con sus intercuartiles (Q1 y Q3), así como el p-valor obtenido del análisis estadístico prueba de rangos con signo de Wilcoxon.

TABLA 9		VARIACION POR TRATAMIENTO (POST/PRE)					
FACTOR SOLUBLE	TOTAL (Q1-Q3)	P-VALOR TOTAL	CPR (Q1-Q3)	P-VALOR CPR	NO-CPR (Q1-Q3)	P-VALOR NO-CPR	
BTLA	0,719 (0,571-0,966)	0,004	0,697 (0,574-1,190)	0,281	0,762 (0,544-0,867)	0,006	
CD27	0,895 (0,761-1,210)	0,766	1,064 (0,742-1,323)	0,427	0,881 (0,734-1,113)	0,638	
CD28	0,632 (0,539-0,910)	0,004	0,645 (0,545-1,434)	0,363	0,674 (0,534-0,848)	0,002	
CD40	0,887 (0,787-1,110)	0,210	0,932 (0,766-1,209)	0,691	0,897 (0,816-1,088)	0,433	
CD80B7-1	0,831 (0,669-1,014)	0,012	0,876 (0,715-1,149)	0,691	0,742 (0,612-0,856)	0,006	
CD86B7-2	0,768 (0,568-1,038)	0,023	0,827 (0,581-1,297)	0,691	0,765 (0,584-0,938)	0,019	
CTLA-4	0,752 (0,486-1,084)	0,010	0,901 (0,547-1,380)	0,478	0,752 (0,429-0,929)	0,008	
GITR	0,732 (0,463-1,011)	0,008	0,842 (0,490-1,605)	0,570	0,732 (0,450-0,832)	0,004	
GITRL	0,851 (0,670-1,008)	0,014	0,846 (0,679-1,181)	0,394	0,878 (0,652-0,987)	0,028	
HVEM	1,088 (0,883-1,304)	0,141	1,163 (0,853-1,321)	0,233	1,099 (1,044-1,305)	0,050	
ICOS	0,774 (0,672-1,027)	0,022	0,781 (0,697-1,258)	0,532	0,769 (0,645-0,984)	0,034	
LAG-3	0,869 (0,769-0,952)	0,001	0,873 (0,802-1,037)	0,125	0,920 (0,796-0,937)	0,003	
PD-1	1,158 (0,922-1,435)	0,063	1,273 (1,015-1,724)	0,053	1,158 (0,907-1,377)	0,480	
PD-L1	0,727 (0,597-1,010)	0,010	0,731 (0,629-1,243)	0,460	0,746 (0,562-0,874)	0,017	
TIM-3	1,196 (1,094-1,392)	0,001	1,121 (1,070-1,531)	0,100	1,239 (1,167-1,370)	0,002	
TLR-2	0,740 (0,614-0,949)	0,003	0,782 (0,635-1,153)	0,281	0,714 (0,642-0,818)	0,006	

TABLA 10A		VARIACION POR TRATAMIENTO (POST/PRE)					
Citoquinas	TOTAL (Q1-Q3)	P-VALOR TOTAL	CPR (Q1-Q3)	P-VALOR CPR	NO-CPR (Q1-Q3)	P-VALOR NO-CPR	
4-1BB	0,876 (0,647-1,802)	0,565	0,985 (0,673-2,654)	0,650	0,774 (0,460-1,399)	0,308	
6Ckine	0,970 (0,831-1,125)	0,727	1,004 (0,821-1,149)	0,776	0,970 (0,919-1,084)	0,875	
Activin A	0,983 (0,653-1,148)	0,524	0,971 (0,696-1,132)	0,532	0,852 (0,619-1,192)	0,308	
AgRP	1,044 (0,882-1,354)	0,254	0,967 (0,833-1,125)	0,910	1,074 (0,942-1,570)	0,209	
ALCAM	1,080 (0,857-1,221)	0,289	1,013 (0,880-1,214)	0,733	1,147 (0,830-1,332)	0,308	
ANG	1,031 (0,941-1,159)	0,052	1,101 (1,001-1,159)	0,027	0,994 (0,920-1,146)	0,695	
ANG-1	0,473 (0,322-0,706)	0,000	0,583 (0,396-1,106)	0,053	0,415 (0,267-0,544)	0,002	
Angiostatin	1,138 (0,943-1,296)	0,020	1,142 (0,965-1,326)	0,041	1,131 (0,874-1,305)	0,480	
AR	0,949 (0,744-1,274)	0,586	0,995 (0,828-1,236)	0,865	0,843 (0,574-1,220)	0,530	
Axl	0,932 (0,805-1,175)	0,813	1,035 (0,901-1,319)	0,733	0,929 (0,776-1,490)	0,754	
B7-1	1,011 (0,824-1,316)	0,992	1,062 (0,911-1,390)	0,363	0,838 (0,603-1,042)	0,209	
BCMA	0,935 (0,773-1,075)	0,185	0,988 (0,813-1,272)	0,865	0,935 (0,783-0,990)	0,136	
BDNF	0,380 (0,170-0,472)	0,000	0,460 (0,323-0,689)	0,017	0,268 (0,118-0,404)	0,002	
bFGF	0,983 (0,691-1,319)	0,586	0,975 (0,695-1,424)	0,609	1,020 (0,760-1,360)	0,937	
BLC	0,987 (0,857-1,620)	0,510	1,014 (0,889-1,774)	0,363	1,041 (0,880-1,386)	0,388	
BMP-4	0,781 (0,713-1,068)	0,039	0,937 (0,693-1,132)	0,191	0,776 (0,741-0,941)	0,182	
BMP-5	0,939 (0,760-1,046)	0,171	1,016 (0,844-1,115)	0,955	0,902 (0,620-0,984)	0,050	
BMP-7	1,006 (0,817-1,260)	0,910	0,996 (0,908-1,271)	0,820	0,906 (0,699-1,207)	0,695	
b-NGF	0,710 (0,558-1,051)	0,011	0,751 (0,565-1,196)	0,112	0,710 (0,611-0,808)	0,084	
BTC	0,827 (0,769-0,997)	0,008	0,813 (0,769-1,098)	0,233	0,827 (0,773-0,958)	0,028	
CathepsinS	0,968 (0,837-1,287)	0,992	1,133 (0,866-1,340)	0,460	0,931 (0,804-1,037)	0,433	
CCL28	0,799 (0,642-1,038)	0,057	0,839 (0,697-1,271)	0,570	0,724 (0,641-0,880)	0,071	
CD 40	0,961 (0,736-1,262)	0,943	0,921 (0,808-1,194)	0,776	1,028 (0,682-1,736)	0,875	
CD14	1,121 (0,905-1,262)	0,094	1,127 (1,015-1,241)	0,100	1,122 (0,933-1,426)	0,117	
CD30	1,010 (0,769-1,112)	0,719	0,994 (0,917-1,079)	0,910	1,012 (0,678-1,124)	0,530	
CD40L	0,792 (0,571-1,030)	0,018	0,967 (0,637-1,077)	0,363	0,741 (0,402-1,029)	0,041	
CEACAM-1	1,041 (0,790-1,156)	0,829	1,041 (0,931-1,153)	0,363	1,042 (0,761-1,181)	0,814	
Contactin-2	0,953 (0,799-1,302)	0,959	0,949 (0,819-1,116)	0,910	0,908 (0,655-1,309)	0,754	
Cripto-1	1,112 (0,723-1,824)	0,074	1,030 (0,817-1,511)	0,201	0,725 (0,640-1,926)	0,530	
CTACK	1,145 (0,902-1,293)	0,023	1,253 (0,996-1,441)	0,031	1,033 (0,911-1,273)	0,272	
CXCL16	1,030 (0,960-1,096)	0,199	1,033 (0,909-1,232)	0,394	1,067 (0,983-1,092)	0,182	
DAN	0,884 (0,758-1,422)	0,869	0,855 (0,713-0,949)	0,233	1,146 (0,750-1,752)	0,433	
DKK-1	0,886 (0,681-1,262)	0,221	0,721 (0,674-1,140)	0,211	0,987 (0,706-1,271)	0,937	
DR6	1,252 (1,041-1,325)	0,000	1,131 (1,025-1,270)	0,027	1,300 (1,043-1,386)	0,015	
Dtk	1,021 (0,790-1,244)	0,992	0,984 (0,846-1,191)	0,691	1,079 (0,793-1,293)	0,695	
E-Cadherin	0,999 (0,870-1,323)	0,992	0,892 (0,757-1,168)	0,334	1,198 (0,911-1,771)	0,272	
EGF	0,566 (0,292-0,943)	0,001	0,858 (0,384-0,978)	0,053	0,544 (0,352-0,715)	0,010	
EGF R	1,032 (0,988-1,113)	0,030	1,018 (0,992-1,126)	0,140	1,084 (1,001-1,115)	0,028	
EG-VEGF	0,891 (0,736-1,318)	0,586	0,904 (0,800-1,524)	0,955	0,847 (0,586-1,156)	0,433	
ENA-78	0,470 (0,182-1,407)	0,022	0,449 (0,234-1,513)	0,069	0,533 (0,228-1,361)	0,308	
Endoglin	0,889 (0,675-1,184)	0,199	0,830 (0,665-1,240)	0,233	0,956 (0,738-1,226)	0,530	
Eotaxin	1,061 (0,935-1,272)	0,043	1,059 (0,936-1,366)	0,173	1,111 (1,000-1,259)	0,084	
Eotaxin-2	1,085 (0,877-1,218)	0,704	1,089 (0,900-1,204)	0,570	1,076 (0,858-1,340)	0,583	
Eotaxin-3	1,180 (0,539-2,692)	0,727	1,471 (0,645-2,628)	0,691	1,396 (0,640-2,948)	0,695	
EpCAM	1,088 (0,621-1,497)	0,789	1,026 (0,511-1,144)	0,570	1,047 (0,624-1,551)	0,937	
ErbB3	0,955 (0,685-1,673)	0,877	0,819 (0,691-1,086)	0,140	1,388 (0,629-2,101)	0,347	
E-Selectin	1,086 (0,892-1,299)	0,141	1,088 (0,863-1,363)	0,334	1,126 (0,996-1,331)	0,239	
Fas	1,317 (1,109-1,580)	0,007	1,185 (1,057-1,565)	0,069	1,471 (1,172-1,921)	0,158	
FAS L	0,885 (0,529-1,386)	0,491	0,775 (0,558-1,276)	0,532	0,970 (0,456-1,598)	0,875	
Fcr RIIBC	0,914 (0,788-1,364)	0,593	0,864 (0,628-0,986)	0,045	1,122 (0,959-1,423)	0,213	
FGF-4	0,952 (0,668-1,145)	0,280	1,046 (0,968-1,157)	0,256	0,793 (0,584-0,952)	0,182	
FGF-7	0,890 (0,655-1,204)	0,245	0,987 (0,769-1,317)	0,776	0,785 (0,602-1,016)	0,239	
Flt-3L	1,291 (1,083-1,835)	0,000	1,297 (1,096-1,565)	0,005	1,202 (1,044-1,702)	0,012	
Follistatin	1,208 (0,929-1,413)	0,049	1,285 (0,892-1,385)	0,281	1,200 (1,045-1,448)	0,117	
Galectin-7	0,903 (0,719-1,668)	0,688	0,897 (0,720-2,200)	0,865	1,115 (0,707-1,543)	0,937	
GCP-2	0,643 (0,374-1,491)	0,563	0,656 (0,410-1,178)	0,675	0,728 (0,428-0,728)	0,953	
G-CSF	0,829 (0,529-1,134)	0,052	0,913 (0,692-1,181)	0,609	0,615 (0,483-0,914)	0,084	
GDF-15	1,185 (1,040-1,268)	0,000	1,247 (1,085-1,304)	0,009	1,115 (1,040-1,316)	0,008	
GDNF	0,932 (0,745-1,142)	0,262	1,063 (0,932-1,182)	0,307	0,783 (0,574-0,920)	0,099	
GH	1,080 (0,734-1,712)	0,586	1,079 (0,667-1,545)	0,609	1,494 (0,750-1,917)	0,347	
GITR	1,108 (0,767-1,521)	0,349	1,161 (0,863-1,448)	0,307	0,994 (0,636-2,044)	0,754	
GM-CSF	0,486 (0,337-0,721)	0,000	0,600 (0,378-1,023)	0,036	0,467 (0,361-0,602)	0,002	
GRO	0,546 (0,330-1,021)	0,028	0,668 (0,395-0,968)	0,036	0,546 (0,396-1,797)	0,638	
HB-EGF	0,940 (0,814-1,295)	0,992	1,016 (0,857-1,318)	0,609	0,871 (0,683-1,036)	0,272	
HCC-1	1,063 (1,009-1,122)	0,004	1,092 (1,055-1,130)	0,001	1,030 (0,960-1,149)	0,239	
HCC-4	1,000 (0,902-1,089)	0,688	1,013 (0,910-1,120)	0,820	1,014 (0,902-1,096)	0,937	
HGF	0,885 (0,506-1,106)	0,022	0,901 (0,641-1,089)	0,156	0,882 (0,508-1,135)	0,182	
HVEM	1,000 (0,825-1,242)	0,813	0,957 (0,820-1,123)	0,363	1,074 (0,851-1,299)	0,530	
I-309	0,837 (0,561-1,028)	0,077	0,884 (0,603-1,129)	0,268	0,730 (0,557-0,867)	0,117	
ICAM-1	0,997 (0,868-1,127)	0,530	0,940 (0,856-1,067)	1,000	1,070 (0,927-1,189)	0,308	
ICAM-2	0,945 (0,840-1,175)	0,644	0,920 (0,842-1,257)	0,910	0,964 (0,828-1,065)	0,388	
ICAM-3	0,766 (0,000-2,950)	0,477	0,720 (0,000-1,858)	0,767	7,803 (5,324-10,282)	0,180	
IFNg	0,542 (0,380-0,674)	0,000	0,642 (0,425-1,087)	0,053	0,519 (0,358-0,587)	0,002	
IGFBP-1	1,275 (0,709-2,023)	0,153	1,232 (0,670-2,916)	0,394	1,118 (0,712-1,461)	0,388	
IGFBP-2	0,989 (0,929-1,071)	0,600	0,998 (0,921-1,054)	0,691	0,984 (0,970-1,013)	0,433	
IGFBP-3	1,098 (0,881-1,309)	0,111	1,074 (0,869-1,448)	0,363	1,100 (0,950-1,227)	0,209	
IGFBP-4	1,020 (0,802-1,321)	0,329	0,816 (0,786-1,020)	0,156	1,310 (1,056-1,640)	0,023	
IGFBP-6	0,963 (0,899-1,032)	0,090	0,959 (0,896-1,024)	0,069	0,984 (0,932-1,050)	0,814	
IGF-I	0,926 (0,784-1,132)	0,245	1,005 (0,802-1,173)	0,820	0,897 (0,740-1,132)	0,347	
IL-1 RI	1,072 (0,771-1,107)	0,845	1,026 (0,771-1,102)	1,000	1,083 (0,822-1,140)	0,937	
IL-10	0,514 (0,328-0,687)	0,000	0,523 (0,369-1,007)	0,031	0,489 (0,366-0,636)	0,003	
IL-10 Rb	1,031 (0,708-1,312)	0,951	0,963 (0,705-1,172)	0,670	1,203 (0,703-1,421)	1,000	
IL-11	0,625 (0,475-0,787)	0,000	0,799 (0,542-0,867)	0,031	0,561 (0,443-0,668)	0,002	
IL-12p40	1,322 (0,936-2,023)	0,017	1,322 (1,052-1,703)	0,069	1,033 (0,833-2,262)	0,239	
IL-12p70	0,570 (0,458-0,898)	0,000	0,578 (0,500-0,951)	0,021	0,514 (0,415-0,803)	0,006	
IL-13	0,599 (0,420-0,805)	0,000	0,654 (0,509-1,117)	0,140	0,503 (0,357-0,684)	0,002	
IL-13 R1	0,859 (0,706-1,285)	0,371	0,863 (0,669-1,259)	0,281	0,856 (0,761-1,295)	0,695	
IL-13 R2	0,961 (0,761-1,232)	0,453	0,992 (0,818-1,384)	0,910	0,915 (0,657-1,035)	0,239	
IL-15	0,659 (0,490-1,097)	0,125	0,929 (0,659-1,237)	0,570	0,491 (0,413-0,664)	0,034	
IL-16	0,792 (0,413-1,254)	0,116	1,100 (0,787-1,725)	0,532	0,498 (0,298-0,808)	0,008	
IL-17	0,758 (0,643-0,976)	0,001	0,834 (0,721-1,135)	0,112	0,726 (0,601-0,834)	0,005	
IL-17B	0,692 (0,470-0,902)	0,001	0,769 (0,599-0,916)	0,069	0,659 (0,458-0,827)	0,023	
IL-17F	0,937 (0,688-1,284)	0,600	0,892 (0,740-2,157)	0,910	1,065 (0,502-1,274)	0,754	

TABLA 10B			VARIACION POR TRATAMIENTO (POST/PRE)			
Citoquinas	TOTAL (Q1-Q3)	P-VALOR TOTAL	CPR (Q1-Q3)	P-VALOR CPR	NO-CPR (Q1-Q3)	P-VALOR NO-CPR
IL-17R	0,716 (0,594-0,982)	<b>0,041</b>	0,821 (0,670-0,987)	0,078	0,709 (0,555-0,791)	0,209
IL-18 BPα	0,896 (0,760-1,112)	0,465	1,038 (0,779-1,294)	0,460	0,896 (0,827-1,025)	0,099
IL-1α	0,808 (0,586-0,918)	<b>0,006</b>	0,908 (0,714-1,143)	0,363	0,633 (0,562-0,860)	<b>0,023</b>
IL-1β	1,138 (0,735-1,923)	0,233	1,132 (0,865-1,683)	0,211	1,195 (0,399-2,531)	0,875
IL-1ra	0,648 (0,565-0,883)	<b>0,005</b>	0,813 (0,674-1,097)	0,394	0,575 (0,472-0,612)	<b>0,004</b>
IL-2	0,526 (0,390-0,723)	<b>0,000</b>	0,636 (0,420-1,133)	0,061	0,499 (0,336-0,606)	<b>0,002</b>
IL-2 Ra	1,084 (0,770-1,362)	0,365	0,937 (0,707-1,218)	0,670	1,136 (0,850-1,400)	0,182
IL-2 Rb	1,101 (0,718-1,508)	0,614	1,082 (0,843-1,438)	0,532	0,774 (0,632-1,528)	0,814
IL-2 Rg	0,871 (0,712-1,306)	0,629	0,894 (0,752-1,255)	0,733	0,829 (0,619-0,977)	0,272
IL-21R	1,177 (0,698-1,504)	0,275	1,251 (0,873-1,568)	0,133	0,937 (0,489-1,408)	0,657
IL-23	1,061 (0,930-1,208)	0,165	1,153 (0,861-1,240)	0,334	1,006 (0,957-1,121)	0,583
IL-28A	0,895 (0,772-1,241)	0,382	1,008 (0,803-1,477)	0,570	0,857 (0,643-1,064)	0,182
IL-29	0,922 (0,833-1,042)	0,058	0,988 (0,879-1,180)	0,776	0,900 (0,836-0,956)	<b>0,041</b>
IL-31	1,143 (0,598-0,949)	0,491	1,766 (0,702-5,009)	0,427	1,322 (0,338-3,021)	0,937
IL-4	0,884 (0,671-1,050)	0,070	0,896 (0,747-1,005)	0,094	0,876 (0,698-1,089)	0,388
IL-5	0,492 (0,338-0,712)	<b>0,000</b>	0,622 (0,389-1,093)	0,069	0,471 (0,318-0,574)	<b>0,002</b>
IL-6	0,664 (0,480-0,804)	<b>0,000</b>	0,746 (0,577-1,082)	0,078	0,562 (0,429-0,760)	<b>0,002</b>
IL-6sR	1,040 (0,970-1,137)	<b>0,028</b>	1,031 (0,961-1,091)	0,233	1,084 (0,988-1,147)	0,084
IL-7	0,528 (0,382-0,684)	<b>0,000</b>	0,585 (0,437-1,027)	0,078	0,523 (0,342-0,628)	<b>0,002</b>
IL-8	0,692 (0,486-0,870)	<b>0,005</b>	0,825 (0,655-1,145)	0,363	0,603 (0,407-0,753)	<b>0,012</b>
IL-9	0,880 (0,814-0,959)	<b>0,000</b>	0,890 (0,846-0,986)	<b>0,031</b>	0,855 (0,817-0,951)	<b>0,008</b>
Insulin	0,743 (0,631-0,904)	<b>0,001</b>	0,774 (0,711-0,942)	<b>0,027</b>	0,692 (0,620-0,808)	<b>0,041</b>
IP-10	1,224 (0,950-1,516)	<b>0,023</b>	1,104 (0,911-1,439)	0,211	1,290 (0,933-2,198)	0,182
I-TAC	0,772 (0,380-1,472)	0,510	0,802 (0,507-1,367)	0,691	0,846 (0,477-2,648)	0,844
LAP	0,678 (0,383-1,149)	<b>0,007</b>	0,669 (0,376-1,263)	0,140	0,670 (0,424-0,809)	<b>0,028</b>
LIF	1,043 (0,897-1,222)	0,382	1,152 (0,920-1,249)	0,069	0,982 (0,887-1,092)	0,754
LIGHT	0,842 (0,656-1,095)	0,058	0,885 (0,735-1,144)	0,307	0,675 (0,556-1,096)	0,182
LIMPII	1,062 (0,640-1,352)	0,719	1,088 (0,714-2,462)	0,609	0,921 (0,529-1,223)	0,347
Lipocalin-2	1,032 (0,948-1,132)	0,106	1,091 (0,950-1,172)	0,173	1,026 (0,970-1,116)	0,136
L-Selectin	0,917 (0,794-1,047)	<b>0,043</b>	0,913 (0,801-1,049)	0,100	0,937 (0,833-1,110)	0,530
Lymphotactin	0,692 (0,396-1,359)	0,230	0,903 (0,554-1,298)	0,798	0,465 (0,373-1,522)	0,286
LYVE-1	0,991 (0,926-1,044)	0,688	1,034 (0,958-1,163)	0,363	0,985 (0,949-1,002)	0,182
MCP-1	0,729 (0,541-1,131)	<b>0,015</b>	0,811 (0,538-1,346)	0,532	0,707 (0,546-0,841)	<b>0,008</b>
MCP-2	0,973 (0,556-1,559)	0,943	1,218 (0,629-1,689)	0,496	0,993 (0,590-1,500)	0,875
MCP-3	0,648 (0,518-1,005)	<b>0,018</b>	0,629 (0,549-1,354)	0,394	0,782 (0,474-0,953)	<b>0,050</b>
MCP-4	0,868 (0,437-1,395)	0,344	0,999 (0,528-1,908)	0,955	0,632 (0,369-1,150)	0,239
MCSF	1,166 (0,833-1,689)	0,262	1,342 (0,957-1,657)	0,125	0,922 (0,458-1,642)	0,754
MCSF R	1,133 (0,985-1,243)	<b>0,002</b>	1,064 (0,987-1,156)	0,061	1,264 (0,958-1,359)	<b>0,028</b>
MDC	1,034 (0,673-1,819)	0,704	1,424 (0,976-2,298)	0,088	0,823 (0,520-1,228)	0,583
MICA	1,044 (0,680-1,475)	0,405	1,259 (0,995-1,627)	<b>0,041</b>	0,680 (0,345-1,137)	0,347
MICB	1,336 (0,904-2,667)	0,115	1,336 (1,034-3,279)	0,286	0,938 (0,748-2,509)	0,515
MIF	0,678 (0,369-0,953)	<b>0,000</b>	0,733 (0,399-0,990)	<b>0,023</b>	0,494 (0,215-0,752)	<b>0,006</b>
MIG	1,958 (1,304-2,692)	<b>0,000</b>	2,106 (1,030-2,394)	0,078	1,692 (1,434-3,681)	<b>0,002</b>
MIP-1a	1,006 (0,889-1,450)	0,491	1,138 (0,963-1,911)	0,156	0,917 (0,737-1,118)	0,433
MIP-1b	0,856 (0,546-1,286)	0,069	0,972 (0,769-1,315)	0,733	0,779 (0,441-0,982)	0,084
MIP-1d	1,220 (1,028-1,434)	<b>0,003</b>	1,215 (1,006-1,418)	0,140	1,353 (1,215-1,616)	<b>0,002</b>
MIP-3a	0,825 (0,506-1,058)	<b>0,038</b>	0,856 (0,644-1,175)	0,244	0,545 (0,475-1,073)	0,136
MIP-3b	1,255 (0,946-1,977)	<b>0,049</b>	1,231 (0,889-1,915)	0,307	1,279 (0,878-2,182)	0,158
MPIF-1	1,009 (0,885-1,260)	0,719	0,963 (0,846-1,150)	0,363	1,161 (0,999-1,470)	0,099
MSPa	0,901 (0,757-1,012)	<b>0,002</b>	0,908 (0,767-1,029)	0,078	0,886 (0,765-0,970)	<b>0,015</b>
NAP-2	0,997 (0,927-1,126)	0,572	1,077 (0,963-1,194)	0,140	0,953 (0,927-1,054)	0,530
NGF R	0,897 (0,780-1,036)	<b>0,030</b>	0,962 (0,846-1,154)	0,532	0,811 (0,711-0,947)	<b>0,041</b>
NrCAM	0,969 (0,730-1,291)	0,428	0,983 (0,714-1,370)	0,427	0,929 (0,764-1,052)	0,583
NRG1-b1	1,017 (0,705-1,364)	0,981	0,980 (0,723-1,261)	0,778	0,898 (0,459-1,120)	0,594
NT-3	0,883 (0,735-1,037)	<b>0,028</b>	0,924 (0,793-1,241)	0,496	0,845 (0,702-1,028)	<b>0,041</b>
NT-4	0,826 (0,730-1,144)	0,120	0,926 (0,806-1,142)	0,496	0,846 (0,708-1,367)	0,433
OPG	0,878 (0,746-1,128)	0,153	0,945 (0,722-1,438)	0,865	0,890 (0,845-0,909)	0,071
OPN	0,997 (0,853-1,146)	0,453	0,949 (0,842-1,178)	0,173	1,023 (0,969-1,154)	0,308
PAI-1	0,823 (0,687-0,984)	<b>0,009</b>	0,836 (0,774-1,180)	0,363	0,773 (0,617-0,966)	<b>0,006</b>
PARC	1,002 (0,957-1,058)	0,750	1,011 (0,981-1,060)	0,394	1,010 (0,945-1,045)	0,754
PDGF Rb	1,012 (0,904-1,133)	0,727	1,060 (0,919-1,175)	0,307	1,018 (0,892-1,060)	1,000
PDGF-AA	0,564 (0,403-0,697)	<b>0,000</b>	0,637 (0,504-0,703)	<b>0,011</b>	0,583 (0,362-0,703)	<b>0,002</b>
PDGF-AB	0,507 (0,335-0,627)	<b>0,000</b>	0,527 (0,387-0,720)	<b>0,005</b>	0,507 (0,307-0,657)	<b>0,002</b>
PDGF-BB	0,602 (0,386-0,788)	<b>0,000</b>	0,685 (0,583-0,936)	<b>0,027</b>	0,511 (0,341-0,742)	<b>0,003</b>
PECAM-1	0,854 (0,588-1,019)	<b>0,017</b>	0,873 (0,732-1,108)	0,211	0,702 (0,551-0,992)	0,099
PF4	1,164 (1,069-1,286)	<b>0,000</b>	1,126 (1,015-1,181)	0,078	1,273 (1,159-1,390)	<b>0,004</b>
PIGF	0,804 (0,641-0,978)	<b>0,019</b>	0,851 (0,727-1,013)	0,191	0,688 (0,612-0,997)	0,182
RAGE	1,261 (1,051-1,578)	<b>0,003</b>	1,224 (1,037-1,666)	<b>0,041</b>	1,227 (1,065-1,468)	0,117
RANTES	0,994 (0,908-1,073)	0,861	0,973 (0,897-1,039)	0,570	1,025 (0,943-1,123)	0,695
Resistin	0,880 (0,760-1,128)	0,057	0,943 (0,819-1,107)	0,460	0,851 (0,708-1,109)	0,099
SCF	0,943 (0,834-1,194)	0,629	0,937 (0,860-1,166)	0,776	1,064 (0,789-1,225)	1,000
SCF R	1,207 (1,074-1,312)	<b>0,000</b>	1,150 (1,067-1,369)	<b>0,001</b>	1,236 (1,179-1,334)	<b>0,002</b>
SDF-1a	0,956 (0,744-1,328)	0,538	0,824 (0,731-1,372)	0,650	1,017 (0,780-1,169)	1,000
SDF-1b	0,917 (0,693-1,529)	0,629	0,927 (0,732-1,528)	0,820	0,852 (0,601-1,140)	0,347
sgp130	0,973 (0,870-1,138)	0,704	0,986 (0,855-1,147)	0,691	0,932 (0,875-1,114)	0,875
Shh N	0,770 (0,498-1,274)	0,482	0,759 (0,508-1,169)	0,363	0,734 (0,448-2,000)	0,814
Siglec-5	1,017 (0,930-1,091)	0,417	1,009 (0,952-1,079)	0,363	1,018 (0,916-1,125)	0,875
ST2	1,052 (0,649-1,446)	0,926	1,033 (0,664-1,320)	0,910	1,172 (0,504-1,457)	0,937
TARC	1,097 (0,896-1,657)	0,116	1,595 (1,011-1,762)	<b>0,020</b>	0,993 (0,803-1,174)	0,875
TECK	1,045 (0,797-1,468)	0,666	1,073 (0,845-1,659)	0,496	1,067 (0,836-1,455)	0,583
TGFα	0,739 (0,547-1,523)	0,221	0,767 (0,639-1,946)	1,000	0,673 (0,397-1,435)	0,209
TGFβ	0,894 (0,754-0,997)	0,066	0,982 (0,855-1,148)	0,865	0,804 (0,728-0,944)	<b>0,041</b>
TGF-β2	0,938 (0,757-1,196)	0,959	0,976 (0,758-1,187)	1,000	0,880 (0,747-1,520)	0,937
TGFβ3	0,945 (0,510-1,220)	0,504	0,917 (0,634-1,452)	0,776	0,897 (0,394-1,198)	0,638
Tie-2	0,945 (0,534-1,207)	0,861	0,831 (0,542-1,097)	0,609	0,855 (0,429-1,483)	0,937
TIM-1	1,363 (0,829-1,691)	<b>0,045</b>	1,389 (1,172-2,193)	<b>0,020</b>	1,128 (0,703-1,774)	0,530
TIMP-1	1,062 (0,992-1,131)	<b>0,006</b>	1,026 (0,973-1,063)	0,256	1,116 (1,057-1,162)	<b>0,023</b>
TIMP-2	1,121 (1,021-1,230)	<b>0,001</b>	1,135 (1,058-1,211)	<b>0,003</b>	1,049 (0,989-1,228)	0,136
TNF RI	1,173 (1,060-1,297)	<b>0,001</b>	1,159 (1,024-1,282)	0,078	1,190 (1,061-1,334)	<b>0,005</b>
TNF RII	1,233 (1,044-1,400)	<b>0,002</b>	1,187 (0,940-1,435)	0,173	1,227 (1,084-1,376)	<b>0,004</b>
TNFα	0,572 (0,409-0,698)	<b>0,000</b>	0,630 (0,435-1,099)	0,088	0,550 (0,358-0,671)	<b>0,002</b>
TNFB	0,544 (0,432-0,747)	<b>0,000</b>	0,627 (0,459-1,040)	0,061	0,519 (0,431-0,608)	<b>0,002</b>
TPO	0,968 (0,656-1,389)	0,975	0,937 (0,622-1,345)	0,955	0,964 (0,656-1,484)	0,875



TABLA 10C	VARIACION POR TRATAMIENTO (POST/PRE)					
Citoquinas	TOTAL (Q1-Q3)	P-VALOR TOTAL	CPR (Q1-Q3)	P-VALOR CPR	NO-CPR (Q1-Q3)	P-VALOR NO-CPR
TRAIL R3	0,763 (0,658-0,995)	0,004	0,831 (0,669-1,018)	0,125	0,751 (0,646-1,003)	0,034
TRAIL-R4	0,752 (0,537-1,143)	0,339	0,682 (0,496-0,823)	0,041	0,936 (0,644-1,948)	0,814
Trappin-2	1,012 (0,952-1,098)	0,517	1,065 (0,992-1,180)	0,125	1,006 (0,943-1,024)	0,695
TREM-1	0,979 (0,724-1,223)	0,734	1,002 (0,772-1,508)	0,460	0,832 (0,686-1,168)	0,347
TSLP	0,648 (0,375-1,239)	0,237	0,705 (0,377-1,340)	0,650	0,497 (0,359-1,208)	0,239
uPAR	0,948 (0,671-1,101)	0,125	0,940 (0,753-1,062)	0,099	1,051 (0,626-1,264)	0,530
VCAM-1	1,164 (0,908-1,657)	0,045	1,149 (0,928-1,348)	0,112	1,164 (0,715-1,678)	0,433
VEGF	0,691 (0,617-0,818)	0,003	0,736 (0,657-0,861)	0,069	0,678 (0,621-0,815)	0,071
VEGF R1	0,737 (0,492-1,476)	0,586	0,689 (0,550-1,021)	0,211	0,637 (0,391-1,529)	1,000
VEGF R2	1,050 (0,917-1,223)	0,096	1,083 (0,906-1,171)	0,268	1,188 (0,980-1,366)	0,084
VEGF R3	0,809 (0,604-1,062)	0,033	0,889 (0,771-1,072)	0,233	0,780 (0,501-1,117)	0,239
VEGF-C	0,837 (0,705-1,158)	0,141	0,837 (0,671-1,463)	0,570	0,827 (0,740-0,957)	0,209
VEGF-D	0,969 (0,743-1,156)	0,465	0,914 (0,750-1,121)	0,334	1,032 (0,724-1,248)	0,937
XEDAR	0,937 (0,753-1,233)	0,504	0,954 (0,917-1,287)	0,820	0,821 (0,555-1,180)	0,272

## 10 ANEXO II. CURRICULUM VITAE Y PUBLICACIONES CIENTÍFICAS

### Academic training

- 2017-2021** **PhD Student** at the University 'Autónoma de Madrid' (Spain).  
**PhD project:** Tumor Microenvironment and immunology in non-small cell lung cancer, supervisors Dr. Mariano Provencio and Dr. Alberto Cruz-Bermúdez.
- 2015-2016** **MBiomed** in Innovation of Biomedical Sciences and Health at León University (Spain).  
**Dissertation project:** "IL-15, on its way to a clinical trial". Anthony Nolan Research Institute (UK), supervisors Aurore Saudemont and Javier Gonzalez Gallego. Mark: 10/10.
- 2007-2012** **BSc in Biology** at the University 'Autónoma de Madrid' (Spain) specialised in Molecular Biology and Genetics.  
**Graduation project:** "Mitochondria in a transgenic mouse model of Huntington's disease". Department of Medicine, supervisor Dr. Pilar Gómez Ramos in Madrid (Spain). Mark: 9.5/10.

### Publications

1. Serna-Blasco R, Sánchez-Herrero E, Sanz-Moreno S, Rodríguez-Festa A, Casarrubios M, Sierra-Rodero B, **Laza-Briviesca R**, Cruz-Bermúdez A, Calvo V, Romero A, Provencio M. KRAS p.G12C mutation occurs in 1% of EGFR-mutated advanced non-small cell lung cancer patients progressing on a first line treatment with a Tyrosine Kinase Inhibitor. *Under review Lung Cancer*.
2. Sierra-Rodero B, Cruz-Bermúdez A, Nadal E, Garitaonandia Y, Insa A, Mosquera J, Casal-Rubio J, Dómine M, Majem M, Rodríguez-Abreu D, Martínez-Martí A, Castro-Carpeño J, Cobo M, López-Vivanco G, Del Barco E, Bernabé Caro R, Viñolas N, Barneto Aranda I, Viteri S, Massuti B, **Laza-Briviesca R**, Casarrubios M, García-Grande A, Romero A, Franco F, Provencio M. Clinical and Molecular Parameters Associated to Pneumonitis Development in Non-small Cell Lung Cancer Patients Receiving Chemoimmunotherapy from NADIM trial. *Under review JITC*.
3. **Laza-Briviesca R**, Cruz-Bermúdez A, Nadal E, Insa A, García-Campelo R, Casal-Rubio J, Huidobro G, Dómine M, Majem M, Rodríguez-Abreu D, Martínez-Martí A, Castro-Carpeño J, Cobo M, López-Vivanco G, Del Barco E, Bernabé Caro R, Viñolas N, Barneto Aranda I, Viteri S, Massuti B, Casarrubios M, Sierra-Rodero B, Tarín C, García-Grande A, Haymaker C, Wistuba I, Romero A, Franco F, Provencio M. Blood Biomarkers Associated to Complete Pathological Response on NSCLC Patients Treated with Neoadjuvant Chemoimmunotherapy Included in NADIM Clinical Trial. *Under review Clinical and Translational Medicine*.
4. Casarrubios M, Cruz-Bermúdez A, Nadal E, Insa A, García-Campelo R, Casal-Rubio J, Dómine M, Majem M, Rodríguez-Abreu D, Martínez-Martí A, Castro-Carpeño J, Cobo M, López-Vivanco G, Del Barco E, Bernabé Caro R, Viñolas N, Barneto Aranda I, Viteri S, Massuti B, Barquin M, **Laza-Briviesca R**, Sierra-Rodero B, Parra E, Sánchez-Espiridión B, Rocha P, Kadara H, Wistuba I, Romero A, Calvo V, Provencio M. Pre-treatment Tissue TCR repertoire evenness is associated to complete pathological response in NSCLC patients receiving neoadjuvant chemoimmunotherapy from NADIM trial. *Under review Clinical Cancer Research*.

5. Cruz-Bermúdez A, García JM, González-Cortijo L, Moreno-Villa RM, Sierra-Rodero, B, Casarrubios M, **Laza-Briviesca R**, Hornedo J, Sainz de la Cuesta R, Murillo R, Hernández-Cortés G, Maximiano C, Martín-Acosta P, Provencio M. Characterization of Warburg-like genes in advanced stages of ovarian carcinoma identifies GAPDH as a good prognosis factor in High-grade serous ovarian carcinoma. *Under review*.
6. Cruz-Bermúdez A, **Laza-Briviesca R**, Casarrubios M, Sierra-Rodero B, Provencio M. The Role of Metabolism in Tumor Immune Evasion: Novel Approaches to Improve Immunotherapy. *Biomedicines* 2021.
7. **Laza-Briviesca R**, Calvo V, Cruz-Bermúdez A, Franco F, Provencio M. Lung Cancer and COVID-19: Therapeutic Implications. *European Journal of Respiratory Medicine* 2021.
8. Provencio M, Nadal E, Insa A, García-Campelo R, Casal J, Dómine M, Majem M, Rodríguez-Abreu D, Martínez-Martí A, De Castro J, Cobo M, López-Vivanco G, Del Barco E, Bernabé R, Viñolas N, Barneto I, Viteri S, Pereira E, Royuela A, Casarrubios M, Salas C, Calvo V, **Laza-Briviesca R**, Romero A, Massuti B, Cruz-Bermúdez A. Neoadjuvant Chemotherapy plus Nivolumab in Resectable Stage IIIA Non Small-Cell Lung Cancer: an open-label, multicentre, single-arm, phase 2 trial. *Lancet Oncology* 2020.
9. Romero A, Serna-Blasco R, Alfaro C, Sánchez-Herrero E, Barquín M, Turpin MC, Chico S, Sanz-Moreno S, Rodríguez-Festa A, **Laza-Briviesca R**, Cruz-Bermúdez A, Calvo V, Royuela A, Provencio M. ctDNA analysis reveals different molecular patterns upon disease progression in patients treated with osimertinib. *TLCR* 2020.
10. Provencio M, Pérez-Barrios C, Barquín M, Calvo V, Franco F, Sánchez E, Sánchez R, Marsden D, Cristóbal Sánchez J, Martín Acosta P, **Laza-Briviesca R**, Cruz-Bermúdez A, Romero A. Next-generation sequencing for tumor mutation quantification using liquid biopsies. *Clin Chem Lab Med* 2020.
11. Cruz-Bermúdez A, **Laza-Briviesca R**, Vicente-Blanco RJ, García-Grande A, Coronado MJ, Laine-Menéndez S, Palacios-Zambrano S, Moreno-Villa MR, Ruiz-Valdepeñas A, Lendinez C, Romero A, Franco F, Calvo V, Acosta PM, Salas C, García JM, Provencio M. Cisplatin resistance involves a metabolic reprogramming through ROS and PGC-1 $\alpha$  in NSCLC which can be overcome by OXPHOS inhibition. *Free Radic Biol Med* 2019.
12. Cruz-Bermúdez A, **Laza-Briviesca R**, Vicente-Blanco RJ, García-Grande A, Coronado MJ, Laine-Menéndez S, Alfaro C, Sánchez JC, Franco F, Calvo V, Romero A, Martín-Acosta P, Salas C, García JM, Provencio M. Cancer-Associated Fibroblasts Modify Lung Cancer Metabolism involving ROS and TGF- $\beta$  signaling. *Free Rad Biol Med* 2019.
13. Cox ST, Danby R, Hernandez D, **Laza-Briviesca R**, Pearson H, Madrigal JA, Saudemont A. Functional characterisation and analysis of the soluble NKG2D ligand repertoire detected in umbilical cord blood plasma. *Front Immunol* 2018.
14. Cruz-Bermúdez A, Vicente-Blanco RJ, **Laza-Briviesca R**, García-Grande A, Laine-Menéndez S, Gutiérrez L, Calvo V, Romero A, Martín Acosta P, García JM, Provencio M. PGC-1 $\alpha$  levels correlates with survival in patients with stage III NSCLC and may define a new biomarker to metabolism-targeted therapy. *Sci Rep* 2017.
15. **Laza-Briviesca R**, Saudemont A, Madrigal JA. Treatment of umbilical cord blood units with interleukin-15 improves hematopoietic stem cell engraftment. *Cir* 2016.
16. **Laza-Briviesca R**, Pearson H, Saudemont A, Madrigal JA, Cox ST. Further polymorphism in the 5' promoter region of the MHC class I-related chain B gene. *Int J Immunogenet* 2016.

17. Cox ST, Pearson H, **Laza-Briviesca R**, Pesoa S, Vullo C, Madrigal JA, Saudemont A. Characterization of 5' promoter and exon 1-3 polymorphism of the RAET1E gene. *Hum Immunol* 2016.
18. Escobedo-Cousin M, Jackson N, **Laza-Briviesca R**, Ariza-MacNoughton L, Luevano M, Derniame S, Querol S, Blundell M, Thrasher A, Soria B, Cooper N, Bonnet D, Madrigal A and Saudemont A. Natural killer cells improve hematopoietic stem cell engraftment by increasing stem cell clonogenicity in vitro and in a humanized mouse model. *PLoS One* 2015.
19. Cox ST, **Laza-Briviesca R**, Pearson H, Soria B, Gibson D, Gomez S, Madrigal JA, Saudemont A. Umbilical cord blood plasma contains soluble NKG2D ligands that mediate loss of natural killer cell function and cytotoxicity. *Eur J Immunol* 2015.
20. **Laza-Briviesca R**, Saudemont A, Madrigal JA, Cox ST. Two novel 5' promoter sequences of the MHC class I-related chain A gene. *Int J Immunogenet* 2015.
21. Cox ST, **Laza-Briviesca R**, Madrigal JA, Saudemont A. Further polymorphism of the RAET1E/ULBP4 gene in humans. *Tissue Antigens* 2014.

#### Mentions in acknowledgments

Clinical grade regulatory T cells selected from umbilical cord blood using a reversible streptamer technology: Implications for off-the-shelf GvHD treatment. *Under Review*

#### Patents

1. WO/2017/032612 - Stem cells with enhanced clonogenic, migratory and homing capacities
2. US20170246217 - Use of cord blood plasma to treat NK cell-mediated diseases and IFN- $\gamma$  mediated diseases
3. EP3193894 - Use of cord blood plasma to treat NK cell-mediated diseases and IFN- $\gamma$  mediated diseases
4. WO/2016/042041 - Use of cord blood plasma to treat NK cell-mediated diseases and IFN- $\gamma$  mediated diseases

#### Oral presentations contribution

- WCLC-2020** Neoadjuvant IO Monotherapy vs. Chemo-IO. Journal of Thoracic Oncology 16(3):S70-S71.
- GECP-2020** T-cell receptor repertoire predicts pathological response in non-small cell lung cancer patients receiving neoadjuvant chemoimmunotherapy at X Educational Symposium.
- SEOM-2020** Pathological response and infiltrated T lymphocytes in patients treated with chemo-immunotherapy neo-adjuvant insight NADIM clinical trial.
- 2018** Tumor Microenvironment and immunology in non-small cell lung cancer treated with neoadjuvant chemo-immunotherapy at Scientific meeting for Puerta de Hierro Hospital, Spain.
- 2018** Tumor Microenvironment and immunology in non-small cell lung cancer treated with neoadjuvant chemo-immunotherapy. Young researchers grant in lung cancer (GECP).
- 2018** Tumor Microenvironment and immunology in non-small cell lung cancer at the Oncology Department at Puerta de Hierro Hospital, Spain.
- 2017** Tumoral microenvironment and identification of response biomarkers in NADIM patients at the First International Scientific Research Summit George Washington at Puerta de Hierro Hospital, Spain.
- 2016** Impact of Natural Killer cells on Haematopoietic stem cell function in cord blood units at Anthony Nolan Research Institute, UK.

- 2016** Whole Cord Blood Unit treatment and memory T cells at Anthony Nolan Research Institute, UK.
- 2015** Impact of Natural Killer cells on Haematopoietic stem cell function in cord blood units at Anthony Nolan Research Institute, UK.
- 2014** Characterisation of NKG2D ligands and promoter regions and expression levels in cord blood samples at Anthony Nolan Research Institute, UK.

## Abstract and posters contribution

- ESMO-2021** Predictive molecular parameters of pneumonitis development in stage IIIA NSCLC patients treated with neo-adjuvant chemo-immunotherapy from NADIM clinical trial. *Journal of Thoracic Oncology* 16(4):S740.
- WCLC-2020** Molecular Insight into NADIM Clinical Trial: Potential Immune Biomarkers of Pathological Response for NSCLC Patients. *Journal of Thoracic Oncology* 16(3):S220-S221.
- WCLC-2020** TCR Repertoire Predicts Pathological Response in NSCLC Patients Receiving Neoadjuvant Chemoimmunotherapy from NADIM Trial. *Journal of Thoracic Oncology* 16(3):S545-S546.
- WCLC-2020** TMB and Selected Mutations in Resectable Stage IIIA NSCLC Patients Receiving Neo-Adjuvant Chemo-Immunotherapy from NADIM Trial. *Journal of Thoracic Oncology* 16(3):S543
- ASCO-2020** Peripheral blood T-cell receptor immune repertoire characterization of stage IIIA non-small cell lung cancer patients receiving neo-adjuvant chemo-immunotherapy treatment from NADIM study *Journal of Clinical Oncology* 38(15\_suppl):9041-9041
- ESMO-2019** Immune cell biomarkers on neo-adjuvant chemo-immunotherapy treatment for resectable stage IIIA NSCLC patients. *Annals of Oncology* 30, v507.
- WCLC-2019** Biomarkers of Pathological Response on Neo-Adjuvant Chemo-Immunotherapy Treatment for Resectable Stage IIIA NSCLC Patients. *Journal of Thoracic Oncology*,14;10-S711.
- ASCO-2019** Haematological biomarkers of pathological response on neo-adjuvant chemo-immunotherapy treatment for resectable stage IIIA non-small cell lung cancer (NSCLC) patients. *J Clin Oncol* 37, 2019 (suppl; abstract e20026).
- 2019** Utility of high sensitivity NGS for EGFR exon 19 mutations detection from circulating free DNA. *Clinica Chimica Acta* 493: S157-S158.
- 2018** Metabolic reprogramming during Cisplatin treatment in NSCLC: implications on PET images and metabolic targeting in Mechanism to Therapies: **Innovations in Cancer Metabolism**.
- 2017** PGC-1alpha levels correlates with survival in patients with stage III NSCLC and may define a new biomarker to metabolism-targeted therapy in **1<sup>st</sup> ASEICA Educational Symposium**.
- 2017** “Microenvironment and metabolism in NSCLC” in **FEB Advanced course on Oncometabolism**.
- EMBT-2017** Use of reversible streptamer technology to isolate clinical grade regulatory T cells from frozen umbilical cord blood units for cell therapy. *Bone Marrow Transplantation*, 52, pagesS165–S166).
- 2016** “Unstimulated natural killer cells differentiated in vitro from umbilical cord blood CD34+ cells kill patient AML blasts in vivo”. Abstract AB01 *Bone Marrow Transplantation*, 51, at the **5<sup>th</sup> NK cell meeting**.
- 2016** “Umbilical cord blood plasma contains soluble NKG2D ligands that mediate loss

of natural killer cell function and cytotoxicity” at the **5<sup>th</sup> NK cell meeting**.  
**EMBT-2015** “Isolation of clinical grade cord blood regulatory T cells using reversible streptamer technology”.

## Laboratory experience

- 2017-2021** **PhD Student** at Fundación para la investigación biomédica Puerta de Hierro Hospital, Madrid, Spain. **Group:** Lung cancer group of Dr. Mariano Provencio. **Project:** Tumor microenvironment and NSCLC patient's immune system within NADIM clinical trial.
- 2019-2020** **Graduate Student-non-UTHSCH** at MD Anderson Cancer Center, Houston, US. **Group:** Translational Molecular Pathology of Dr. Ignacio Wistuba. **Project:** Multiplex IF on NSCLC from NADIM clinical trial.
- 2015-2016** **Research assistant** at the Anthony Nolan Research Institute, London, UK. **Group:** Immunotherapy group of Dr Aurore Saudemont. **Projects:** Development of a potential clinical trial using cytokines in cord blood transplantation and Impact of NK cells on haematopoietic stem cell clonogenic capacity and engraftment.
- 2013-2014** **Industrial Placement** at the Anthony Nolan Research Institute, London, UK. **Group:** Immunotherapy group of Dr Aurore Saudemont. **Project:** Characterisation of NKG2D ligands and promoter regions by Sanger Sequencing and soluble expression levels in cord blood samples.
- 2011-2012** **Student** at the Department of Medicine at University ‘Autónoma de Madrid’, Spain. **Group:** Neuroscience of Dr. Pilar Gomez. **Project:** Mitochondria in a transgenic mouse model of Huntington's disease.

## Techniques acquired

- **Molecular biology:** DNA and RNA extraction, conventional PCR, agarose gel electrophoresis, DNA purification and sequencing (Sanger, NGS).
- **Genetic:** cloning using competent cells.
- **Histology:** study of different section of the mouse brain tissue embedded in paraffin, haematoxylin and eosin stain, DNA and RNA extraction using Covaris.
- **Cell culture:** blood processing (Ficoll), immune cell isolation using magnetic beads, immune cell characterisation using flow cytometer (surface staining, CFSE labelling, viability staining, functional assay), haematopoietic stem cell clonogenicity using colony forming unit (CFUs), immune cell activation by cytokines, enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) and NK cells differentiation cultures.
- Transmission electron microscope (TEM), confocal, fluorescence (FM) and optical microscope.
- Rat and mouse dissections.

## Continuing Education

- 2020** Location, management and ethical use of bibliographic resources in academic and research publications at Autonoma University of Madrid with 2 ECTS.
- 2019** Immune-profiling Strategies for Tissue Specimens at The University of Texas MD Anderson Cancer Center Houston (US). Council for Continuing Medical Education with 1 credit.
- 2019** IASLC 20th WCLC. Council for Continuing Medical Education with 12,75 credits.
- 2018** IASLC 19th WCLC. Council for Continuing Medical Education with 16,5 credits.
- 2018** Ion Chef and Ion Genestudio S5 Plus training from ThermoFisher Scientific.



- 2018** IV Forum Immunology and Immunotherapy in cancer. Council for Continuing Medical Education with 1,1 credits.
- 2017** Clinical practice and review of medical oncology. Council for Continuing Medical Education with 7 credits.
- 2017** English C1 advanced from Crack Business.
- 2017** Advances and perspectives in Immunology and Immunotherapy at “Alberto Sols” Biomedical Research Institute. Certificate with 1 ECTS for UAM.
- 2017** Biology and pathogenesis of cancer at Puerta de Hierro Hospital. Council for Continuing Medical Education with 4,1 credits.
- 2017** Research meetings of Puerta de Hierro Hospital. Council for Continuing Medical Education with 3 credits.
- 2014** Liquid nitrogen manipulation certificate.

## Grants and awards

- 2020** Best oral communication at SEOM Congress 2020.
- 2019** PhD contract program from the Spanish government (PEJD-2018-PRE/SAL-8641).
- 2018** Register as research personnel in training by Autonoma University of Madrid.
- 2018** Award of Young researchers in lung cancer from GECP.
- 2017** Research assistant contract program from the Spanish government (PEJ16/MED/AI-1972).
- 2016** Grant received from the Spanish government to study a Master’s degree.
- 2010** Grant received from the Spanish government for academic achievement to fund the next year of BSc degree.

## International Scientific meetings attended

- 2020** XI Multidisciplinary approach of lung cancer. Puerta de Hierro Hospital, Madrid (Spain).
- 2020** ITERT Trainee Seminar Series. Translational Molecular Pathology & Neurosurgery at The University of Texas MD Anderson Cancer Center, Houston (US).
- 2019** Symposia on Cancer Research: Leading Edge in Cancer Research. The University of Texas MD Anderson Cancer Center, Houston (US).
- 2019** 1st International Symposium in SCLC, Madrid (Spain).
- 2019** X Multidisciplinary approach of lung cancer. Puerta de Hierro Hospital, Madrid (Spain).
- 2018** IX Educational Symposium of the Spanish Lung Cancer Group, Madrid (Spain)
- 2018** Biomarkers on Immune-Oncology. Fundación ECO, Madrid (Spain)
- 2018** IX Multidisciplinary approach of lung cancer. Puerta de Hierro Hospital, Madrid (Spain).
- 2017** 1st ASEICA Educational Symposium, Universidad Autónoma de Madrid (Spain)
- 2017** New perspectives in lung cancer research, Fundación Ramón Areces, Madrid (Spain)
- 2017** VIII Multidisciplinary approach of lung cancer. Puerta de Hierro Hospital, Madrid (Spain).
- 2016** BSBMT Scientific Day at School of Oriental & African Studies, London (UK)
- 2016** 5<sup>th</sup> UK NK cell meeting at Imperial College London (UK)
- 2015** UCL infection, immunology and inflammation symposium, London (UK).
- 2015** BSBMT Scientific Day at School of Oriental & African Studies, London (UK)
- 2015** BD horizon Tour: New insights for multicolour panel design at Queen’s Mary University, London (UK)
- 2015** 4<sup>th</sup> UK NK cell meeting at University College London.
- 2014** UCL infection, immunology and inflammation symposium, London (UK).

**2014** BSBMT Education Day at School of Oriental & African Studies, London (UK).

**2014** BSBMT Scientific Day at School of Oriental & African Studies, London (UK).

**2014** NK cell meeting at King's College, Cambridge (UK).

**2013** UCL Cancer Institute 6<sup>th</sup> Annual Conference, London (UK).

## Computer skills

- Sequencing analysis programs: Factura 2.2.2, Sequencing analysis, Match Tools, Finch TV and Assign.
- Flow cytometry analysis: FlowJo.
- Management and analysis of statistic results: GraphPad design by Prism, SPSS.
- Microsoft office: Internet and email, Word, Excel, Access and PowerPoint.

## Languages

- Spanish: mother tongue
- English: IELTS Certificate with an overall mark of 7.0 (C1). First certificate of Cambridge (B2). Lived in London (UK) 4 years (2012-2016) and in Houston (US) 3 months (2019-2020).

## References

Dr. Mariano Provencio (mprovencio@gmail.com)

Dr. Alberto Cruz Bermúdez (alberto.cruz.bermudez@gmail.com)

Prof. Alejandro Madrigal (a.madrigal@ucl.ac.uk)

Dr. Aurore Saudemont (saudemontauore@gmail.com)

Dr. Ignacio Wistuba (iiwistuba@mdanderson.org).